

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANDREA THOMAZ SOCCOL**

**DESENVOLVIMENTO DE DERMOCOSMÉTICOS À BASE DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE MACROMICETO,  
CIANOBACTÉRIA E MELATONINA NA REDUÇÃO DE POROS,  
RUGAS E MANCHAS EM PELE HUMANA**

**CURITIBA  
2014**

**ANDREA THOMAZ SOCCOL**

**DESENVOLVIMENTO DE DERMOCOSMÉTICOS À BASE DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DE MACROMICETO,  
CIANOBACTÉRIA E MELATONINA NA REDUÇÃO DE POROS,  
RUGAS, MANCHAS E FLACIDEZ EM PELE HUMANA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná - UFPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor. Área de Concentração: Saúde Humana e Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

**CURITIBA  
2014**

## RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO


Aos trinta dias do mês de maio de 2014, na Sala de Aula do Prédio CENBAPAR do Setor de Tecnologia do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Quinta Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos Professores Doutores Adenise Lorenci Woiciechowski (UFPR), Cristine Rodrigues (UFPR), Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), Rosália Rubel (UFPR/FPP), Sandra Regina Barroso Ruiz Sella (CPPI), e Carlos Ricardo Soccol (UFPR– orientador da tese).

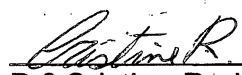
Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Andrea Thomaz Soccol Scholz** a fazer a apresentação da Tese intitulada: “Desenvolvimento de dermocosméticos à base de compostos bioativos de basidiomiceto, cianobactéria e melatonina na redução da flacidez, poros, rugas e manchas em pele humana”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores Drª Adenise Lorenci Woiciechowski, Drª Cristine Rodrigues, Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Drª Rosália Rubel, Drª Sandra Regina Barroso Ruiz Sella, e Dr Carlos Ricardo Soccol declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 30 de maio de 2014




Profª Drª Adenise L Woiciechowski



Drª Cristine Rodrigues



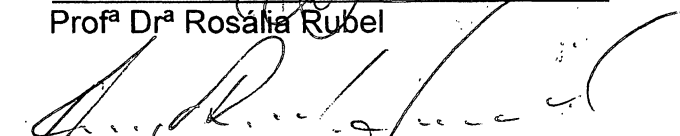
Profª Drª Luciana P S Vandenberghe



Profª Drª Rosália Rubel



Profª Drª Sandra Regina B Ruiz Sella



Prof Dr Carlos Ricardo Soccol

*Dedico este Trabalho*

*À Deus nosso criador, que possa sempre estar seguindo o caminho por  
Ti determinado.*

*Aos meus pais, Carlos Ricardo Soccol e Vanete Thomaz  
Soccol, exemplos de vida e de dedicação à pesquisa científica,  
sem vocês nada teria sentido.*

*Ao meu marido querido, pela dedicação e paciência, amor de  
minha vida;*

*As minhas filhas amadas Julia e Emanuele razão maior de  
minha existência, amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

A coordenadora do curso de Pós-Graduação, Professora Dra Luciana Vandenberghe pela dedicação e empenho dispensados ao curso de Pós Graduação. E muito colaborou com este trabalho.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro.

Ao Corpo docente do Curso de Pós-Graduação, pelo estímulo constante da busca e aperfeiçoamento.

À Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À secretária do departamento de otorrinolaringologia Neidiane Tonel pela ajuda na seleção dos pacientes.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida  
passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se  
fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa  
me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade  
viver...”*

*Martin Luther King*

## RESUMO

O envelhecimento da população vem gerando crescente preocupação com a saúde e a beleza. O objetivo do presente estudo foi avaliar as propriedades dermatológicas de cremes produzidos com extratos aquosos de esporos de *Ganoderma lucidum*, extratos aquosos de biomassa de *Spirulina platensis* e melatonina. Elaborou-se uma composição básica de creme que foi acrescida de dois compostos bioativos, denominados Fórmula 1 e Ativo 1. A Fórmula 1 era composta de um creme de composição básica acrescido de 10% (g/g) de extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* concentrado a 50% e melatonina a 0,01%. O Ativo 1 era composto por 10% (g/g) de extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* concentrado a 50%. Estes foram testados *in vitro* em cultivo celular de fibroblastos humanos e em melanócitos murinos, submetendo-os às análises imunohistoquímicas e anatomopatológicas. Na segunda fase do estudo foi realizado um ensaio clínico randomizado, duplo cego, para avaliação dos cinco (05) biocremes. Os biocremes foram denominados A, E, I, O e U. Para análise objetiva da avaliação dos resultados da ação de cada biocreme na pele humana, optou-se por realizar as análises no equipamento VisioFace® (Courage e Khazaka, Germany), que fornece dados analíticos objetivos como dimensões dos poros, manchas e rugas. O composto BIOATIVO 1 foi capaz de elevar significativamente ( $p < 0,01$ ) a atividade da enzima superóxido dismutase, evidenciando sua extrema capacidade antioxidante. O composto BIOATIVO 1 quando testado em fragmentos de pele submetidos à irradiação tiveram níveis de ação antioxidante comparável aos do padrão Trolox e aumentados em 100% em comparação ao grupo controle, irradiado. O creme A (base de extrato aquoso de *Spirulina* e melatonina) promoveu redução em média de 61% para poros grandes e de 56,63% para manchas ultravioletas  $p < 0,01$ . O creme O (extrato aquoso de esporos de *Ganoderma* e melatonina) também se destacou em seus resultados, apresentando em média 55,9% de redução percentual de manchas. Conclui-se que os dermocremes desenvolvidos e testados em pele humana possuem atividades antioxidantes importantes, antimelanogênica e promotora de neocolageogênese.

**Palavras-chave:** *Ganoderma lucidum*; *Spirulina platensis*, dermocosméticos, melatonina, antioxidante.

## ABSTRACT

The aging population is generating increasing concern with health and beauty. The aim of this study was to evaluate the properties of dermatological creams made with extracts of *Ganoderma lucidum* spore extract of *Spirulina platensis* obtained by fermentation in liquid state and melatonin. Stabilized preparation of an active and a cream nominated "Active 1" and "Formula 1". Formula 1 was comprised of 10% cream prepared extract of *Ganoderma* spores concentrated to 50% and melatonin to 0.01%. Formula 1 consisted of 10 % extract of *Ganoderma* spores concentrated to 50% were tested in cell culture of human - murine fibroblasts and melanocytes, subjecting them to immunohistochemistry and pathological analysis. In the second phase of the study was done by a randomized and double blind study to evaluate 5 biocremes trial. For analysis of the results of the cream was chosen by VisioFace® (Courage & Khazaka, Germany) - a system that provides objective analytical data as pore size, spots and wrinkles. ACTIVE 1 product was able to significantly ( $P < 0.01$ ) increase the activity of superoxide dismutase, showing its extreme antioxidant capacity. Fragments of skin subjected to irradiation treated with Formula 1 had levels of antioxidants, comparing to Trolox, increased 100 % compared to the irradiated control group. Five biocremes (A, E, I, O and U) were prepared and tested in humans. The biocrema A (spore extract of *Spirulina* and Melatonin) promoted an average reduction of 61 % for large pores and reduction of 56.63 % for ultraviolet spots  $p < 0.01$ . The Biocrema O (*Ganoderma* extract and melatonin) also give excelled results, it was on average 55.9% reduction in the percentage of spots. It possible concluded that the biocremes have important anti-spots action, inducing collagen and antioxidant activities.

**Keywords:** Extract of *Ganoderma lucidum*; extract of *Spirulina platensis*, skin care products, melatonina, antioxidants.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Camadas da pele e a deposição de melanina .....	21
<b>Figura 2:</b> Disposição dos melanócitos na epiderme e sua interpelação com os ceratinócitos .....	22
<b>Figura 3:</b> Formação dos melanócitos .....	23
<b>Figura 4:</b> Esquema de produção e distribuição de melanina na epiderme, através dos melanossomas.....	23
<b>Figura 5:</b> Esquema ilustrativo da formação da pigmentação da pele .....	24
<b>Figura 6:</b> Esquema mostrando as vias da melanogênese.....	25
<b>Figura 7:</b> <i>Ganoderma lucidum</i> .....	29
<b>Figura 8:</b> Fotomicrografia da microalga <i>Spirulina</i> .....	33
<b>Figura 9:</b> Via de biossíntese da melatonina na pele.....	40
<b>Figura 10:</b> Resposta da melatonina induzida por estresse oxidativo.....	41
<b>Figura 11:</b> Efeitos da melatonina na pele Melatonina sintetizada intra ou extracelular pode regular o fenótipo da pele através da interação com receptores de melatonina.....	43
<b>Figura 12:</b> Efeitos do produto denominado ATIVO 1 sobre a atividade da enzima Superóxido Dismutase em cultura de fibroblastos humanos .....	53
<b>Figura 13:</b> Efeito do ATIVO 1 sobre a atividade da enzima tirosinase .....	54
<b>Figura 14:</b> Teor de melanina em culturas de melanócitos murinos incubados com ATIVO 1 .....	55
<b>Figura 15:</b> Efeitos da FORMULAÇÃO 1 na produção de radicais livres em fragmentos de pele <i>ex vivo</i> .....	56
<b>Figura 16:</b> Avaliação eco método Fontana Masson .....	57
<b>Figura 17:</b> Avaliação de PAR-2 por imunohistoquímica .....	58
<b>Figura 18:</b> Efeitos do produto ATIVO 1 sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos após 48 horas de incubação .....	59
<b>Figura 19:</b> Efeitos do produto FORMULAÇÃO 1 sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos após 48 horas de incubação .....	60
<b>Figura 20:</b> Classificação segundo biótipo da pele dos participantes do experimento .....	61
<b>Figura 21:</b> Percentual dos pacientes avaliados e divididos segundo à classificação de Glogau .....	61
<b>Figura 22:</b> Pacientes avaliados divididos segundo classificação de Fitzpatrick .....	62

<b>Figura 23:</b> Pacientes avaliados divididos segundo classificação de Mark-Rubin.....	62
<b>Figura 24:</b> Pacientes distribuídos segundo a classificação do grau de flacidez da pele .....	63
<b>Figura 25:</b> Percentual de melhora para o parâmetro hidratação para a pele facial com 30 dias de avaliação.....	64
<b>Figura 26:</b> Percentual de melhora para o parâmetro hidratação para a pele facial com 60 dias de avaliação.....	64
<b>Figura 27:</b> Percentual de melhora para o parâmetro hidratação para a pele facial com 60 dias de avaliação.....	65
<b>Figura 28:</b> Percentual de melhora para o parâmetro flacidez para a pele facial com 30 dias de avaliação.....	65
<b>Figura 29:</b> Percentual de melhora para o parâmetro flacidez para a pele facial com 60 dias de avaliação.....	66
<b>Figura 30:</b> Percentual de melhora para o parâmetro flacidez para a pele facial com 90 dias de avaliação.....	66
<b>Figura 31:</b> Percentual de melhora da presença de manchas na pele facial com 30 dias de avaliação .....	67
<b>Figura 32:</b> Percentual de melhora da presença de manchas na pele facial com 60 dias de avaliação .....	67
<b>Figura 33:</b> Percentual de melhora da presença de manchas na pele facial com 90 dias de avaliação .....	68
<b>Figura 34:</b> Percentual de melhora da presença de rugas na pele facial com 30 dias de avaliação .....	68
<b>Figura 35:</b> Percentual de melhora da presença de rugas na pele facial com 60 dias de avaliação .....	69
<b>Figura 36:</b> Percentual de melhora da presença de rugas na pele facial com 90 dias de avaliação .....	69
<b>Figura 37:</b> Resultado da somatória de todos os parâmetros avaliados para as formulações A a O.....	70
<b>Figura 38:</b> Avaliação da redução dos parâmetros poros pequenos (PP) poros grandes (PG), manchas na pele como número de rugas (NR), percentual de rugas (%R) e manchas ultravioleta (UV) em face de pessoas das faixas etárias de 30 a 70 anos.....	71
<b>Figura 39:</b> Avaliação da redução do parâmetro rugas na face de pessoas das faixas etárias de 30 a 70 anos .....	73
<b>Figura 40:</b> Percentual de redução de Poros Pequenos por faixa etária .....	77
<b>Figura 41:</b> Percentual de redução por faixa etária de Poros Grandes.....	77
<b>Figura 42:</b> Percentual de redução por faixa etária do número de manchas ....	78
<b>Figura 43:</b> Redução do percentual de manchas.....	78

<b>Figura 44:</b> Redução de Manchas UV .....	79
<b>Figura 45:</b> Redução do Volume de rugas .....	79
<b>Figura 46:</b> Redução da Profundidade das rugas .....	80
<b>Figura 47:</b> Redução da Área das Rugas .....	80
<b>Figura 48:</b> Redução do percentual de área das rugas .....	81

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1:</b> Escala para classificação do potencial citotóxico estabelecida intralaboratorialmente para ativos e produtos cosméticos.....	49
<b>Tabela 2:</b> Percentual de redução de diferentes parâmetros avaliados em pele facial de mulheres classificadas em três faixas etárias .....	72
<b>Tabela 3:</b> Percentual de redução dos diferentes parâmetros avaliados para quatro biocremes frente ao grupo controle.....	73
<b>Tabela 4:</b> Resultados dos cremes versus o fototipo segundo a classificação de Fitzpatrick, quanto a análise dos poros .....	74
<b>Tabela 5:</b> Resultados dos cremes versus o fototipo segundo a classificação de Fitzpatrick, quanto à análise das manchas .....	74
<b>Tabela 6:</b> Resultados dos cremes versus o fototipo segundo a classificação de Fitzpatrick, quanto a análise das rugas .....	75
<b>Tabela 7:</b> Resultados dos cremes versus o tipo de pele segundo classificação de Glogau, quanto a avaliação de poros (pequenos e largos).....	76
<b>Tabela 8:</b> Resultados dos cremes versus o tipo de pele segundo classificação de Glogau, quanto a análise de manchas (número, percentual e UV) .....	76
<b>Tabela 9:</b> Resultados dos cremes versus o tipo de pele segundo classificação de Glogau, quanto a análise de Rugas .....	76
<b>Tabela 10:</b> Redução de diferentes parâmetros por faixa etária .....	81
 <b>Quadro 1:</b> Classificação da pele proposta por Fitzpatrick .....	 28
<b>Quadro 2:</b> Formulações das preparações dos cremes denominados de A a U .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IL-1: Interleucina 1

IL-2: Interleucina 2

IL-3: Interleucina 3

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-12: Interleucina 12

TNF $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

IFN-gamma – Interferon gama

NFkB - factor nuclear kappa B

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

PCR- Reacção em cadeia da polimerase

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucleico (RNA mensageiro)

$\alpha$ -MSH - *melanocyte stimulating hormone alfa*

$\beta$ -MSH - *melanocyte stimulating hormone beta*

LDL - *Low Density Lipoproteins*,

HDL - *High Density Lipoproteins*

RUV - raios ultra violetas

MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	19
2.1 GERAL	19
2.2 ESPECÍFICOS	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	19
3.1 PELE	19
3.2 SÍNTESE DA MELANINA	21
3.3 MELANOSSOMAS	23
3.4 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DE PELE	27
3.5 <i>GANODERMA LUCIDUM</i>	29
3.6 <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>	32
3.6.1 Efeitos Antioxidantes e Anti-Inflamatórios da Spirulina	34
3.7 MELATONINA	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	44
4.1 FASE 1 – Teste <i>in vitro</i> da atividade da Fórmula 1 e Ativo 1	44
4.1.1 Cultura de Fibroblastos Humanos para Teste do Potencial Citotóxico	44
4.1.2 Incubação com o Produto Teste	45
4.1.3 Cultura de Melanócitos Murinos B16F10	45
4.1.4 Determinação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	46
4.1.5 Determinação da Atividade da Enzima Tirosinase	46
4.1.6 Determinação do Teor de Melanina	46
4.1.7 Incubação de Fragmentos de Pele <i>ex vivo</i>	47
4.1.8 Simulação de Estresse Solar (irradiação UVA/UVB)	47
4.1.9. Determinação da Atividade Antioxidante	47
4.1.10 Determinação de Citotoxicidade	48
4.1.11. Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)	48
4.1.12 Determinação da Atividade Antioxidante	49
4.1.13. Análise Estatística	50
4.2 FASE 2: ENSAIO CLINICO	50
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
<b>5. RESULTADOS</b>	53
5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SOD	53
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE	54
5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MELANINA	54
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	55
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO (VIABILIDADE CELULAR)	59

5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO (VIABILIDADE CELULAR)	59
5.7 ANÁLISE QUALITATIVA DOS CREMES ESTUDADOS .....	60
5.8 ANÁLISE QUALITATIVA .....	63
5.9 ANÁLISE QUANTITATIVA .....	70
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	82
6.1 AÇÃO ANTIOXIDANTE .....	82
6.2 AÇÃO FOTOPROTETORA E PROMOTORA DE COLAGEOGÊNESE.....	83
6.3 AÇÃO DESPIGMENTANTE .....	84
6.4 SEGURANÇA E CITOTOXICIDADE .....	85
6.5 ANÁLISES DOS BIOCREMES EM PACIENTES .....	86
6.5.1 Perfil Paciente Incluído no Estudo .....	86
6.5.1.1 Fase Subjetiva .....	87
6.6 RESULTADOS DO CREME PELA ANÁLISE OBJETIVA .....	88
6.7 ANÁLISE RESULTADOS BIOCREMES QUANTO ÀS FAIXAS ETÁRIAS	89
6.8 ANÁLISE RESULTADOS BIOCREMES QUANTO À CLASSIFICAÇÃO FITZPATRICK .....	91
6.9 ANÁLISE RESULTADOS BIOCREMES QUANTO À CLASSIFICAÇÃO GLOGAU .....	92
<b>7. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS</b> .....	95
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	97
<b>APÊNDICES</b> .....	110
<b>Apêndice 1:</b> Análise da Classificação Fitzpatrick .....	110
<b>Apêndice 2:</b> Tabela de Redução por Idade .....	125

## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população vem gerando crescente preocupação com a saúde e a beleza, o que tem provocando profundas mudanças na ordem econômica e social da humanidade. A economia americana movimentou cerca de um trilhão de dólares, em 2011 na indústria do bem-estar (*Wellness Industry*). Um dos grandes segmentos da indústria do bem estar são os dermocosméticos, produtos que possuem como objetivo proporcionar melhorias à saúde da pele.

Os consumidores cada vez mais se conscientizam dos malefícios de produtos químicos artificiais, presentes em dermocosméticos. Sabe-se que os parabenos e ftalatos agem como desreguladores endócrinos. Os desreguladores endócrinos são substâncias químicas que promovem alterações no sistema endócrino humano e, conseqüentemente, nos hormônios produzidos. Há associações envolvendo a presença destas substâncias no organismo humano e o surgimento de algumas doenças como câncer (de testículo, de mama e de próstata), queda na produção de espermatozoides, disfunção da tireoide e alterações relacionadas com o sistema neurológico (Jablonski e Chaplin, 2000; Hearing, 2005; Sulem et al. 2007; Lin e Fisher, 2007). Frente a esse cenário existe uma busca, dos consumidores, por produtos naturais para uso na fabricação de dermocosméticos.

O estresse oxidativo está relacionado com a produção de radicais superóxido em sistemas biológicos. Espécies reativas de oxigênio (ROS) liberados a partir de células fagocíticas iniciam uma grande variedade de reações oxidativas tóxicas e a formação excessiva de ROS provoca a apoptose celular. Antioxidantes estão sendo utilizados em dermatocosmetologia por agirem como varredores de radicais livres, possuindo efeito antirrugas. Os antioxidantes agem profundamente nas vias de sinalização intracelular, as quais estão envolvidas na lesão da pele e agem contra o foto envelhecimento, assim como podem evitar rugas e inflamação da pele. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é secretada na glândula pineal e possui amplo espectro de efeitos biológicos. Sua presença tem sido detectada em muitos tecidos (Mosher et al. 1999; Ortonne, 2005; Costin e Hearing, 2007; Miot et al. 2007). É um hormônio altamente lipofílico, consegue atravessar membranas celulares e facilmente alcançar todos os compartimentos subcelulares, incluindo as mitocôndrias (Jablonski e Chaplin,



2000). A melatonina reduz o estresse oxidativo eliminando radicais livres e aumentando a expressão de enzimas antioxidantes (Relethford, 1997). Possui efeitos contra proliferação de células tumorais, modula o sistema imune e exhibe propriedades anti-envelhecimento, além de bioregulação do sono e ritmo circadiano (Mosher et al. 1999; Abdel-Malek et al. 2001; Sulaimon e Kitchell, 2003; Sulem et al. 2007; Lin e Fisher, 2007).

A melatonina tem sido isolada na pele de mamíferos. Além das ações já correntemente descritas na literatura ela vem ganhando notoriedade por sua ação na inibição da melanogénese, no crescimento de melanócitos e ação fotoprotetora contra danos induzidos pela luz UV (Bleehen et al. 1992; Thody e Graham, 1998; Jones et al. 2002; Wagner et al. 2002; Bolognia e Orlow, 2003; Ito, 2003; Rouzaud et al. 2005; Murisier e Beermann 2006; Storm e Elder, 2006).

*Ganoderma lucidum* é um basideomiceto e seu corpo de frutificação vem sendo utilizado na medicina oriental há mais de 2000 anos (Hseu et al. 1996; Hsieh e Wu al. 2012). Estudos comprovaram a ação de metabólitos de *G. lucidum* na modulação da resposta imune e seu potencial de inibição de células neoplásicas (Mayzumi et al. 1997; Zhou et al. 2007, Paterson 2006, 2008). A ação anti-oxidante de *G. lucidum*, poderia proteger as células atenuando lesão causada pelo estresse oxidativo (Bensky et al. 2004). Quase todos os tipos de células expressam esfingomielinase (SMase) e a produção de ceramida intracelular aumenta a atividade hidrolítica de Smases (Lee et al. 1984). A ceramida é um mediador lipídico intracelular que responde a estímulos diversos, incluindo o estresse. O oxidante  $H_2O_2$ , induz um rápido aumento nos níveis de ceramida devido à hidrólise de esfingomielina (SM). Kao et al. 2012, demonstraram que a atividade  $\beta$ -1,3-glucano é capaz de interferir com as Smases. Assim, os autores identificaram o  $\beta$ -1,3-glucano de *G. lucidum* como uma fonte potencial antioxidante.

*Spirulina* é uma alga azul-verde (cianobactéria) que é consumida como alimento desde os tempos antigos pelos mexicanos e nativos na área do Lago Chade. Atualmente é comercializada como suplemento alimentar (nutracêuticos), devido aos seus elevados teores de proteínas, ácidos  $\gamma$ -linolênicos, vitaminas e minerais. Há, na literatura, relatos sobre as implicações terapêuticas de *Spirulina* tais como seu impacto em pacientes portadores de

diabetes, artrite, anemia, doenças cardiovasculares e câncer (Vonshak, 1997; Gershwin e Belay, 1997; Khan et al. 2005; Karkos et al. 2008).

*Spirulina* também é incorporada em vários produtos alimentares para melhorar suas qualidades nutricionais e em preparados usados em terapêutica de doenças crônicas (Ciferri e Tiboni, 1985). A *Spirulina* possui propriedades antioxidantes, que são atribuídas a moléculas como ficocianina,  $\beta$ -caroteno, tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolênico e de compostos fenólicos (Abdulqader et al. 2000). O selênio presente na ficocianina da *Spirulina* possui atividade intensa para eliminar radicais superóxido e de peróxido de hidrogênio (Habib et al. 2008). A ingestão de *Spirulina* mostrou efeito preventivo contra os danos na musculatura esquelética sob estresse oxidativo induzido pelo exercício (NCEP, 2002). A *Spirulina* também possui efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por acetato de chumbo no fígado e em rins de ratos (Barter et al. 2007). Alimentação com *Spirulina platensis* também reduziu a hepatotoxicidade induzida por cádmio em ratos e o efeito foi devido suas propriedades antioxidantes (Sharma et al. 2009).

A hiperpigmentação da pele é devida a vários fatores, dentre eles, envelhecimento, gravidez, distúrbios endócrinos, tratamento com hormônios sexuais e exposição ao sol em diferentes graus. Muitos estudos provam que as radiações de luz solar são as principais responsáveis pela maioria das discromias, seguidas pelos hormônios e/ou fatores externos (Wang e Wang, 2006). A pele é, em essência, um órgão de proteção do corpo contra danos físicos, químicos e agentes patogênicos. Uma função que se destaca é a proteção contra os danos físicos causados pelo sol. O papel fisiológico da melanina consiste, fundamentalmente, em prover a cor da pele e a absorção de cromóforos, gerando foto proteção natural. A melanina difrata ou reflete a radiação de raios ultravioleta (UV). Após a irradiação, os melanossomas se reagrupam em torno do núcleo e protegem, assim, o material genético da célula. Muitas são as modificações patológicas da cor da pele e são denominadas discromias (Fischer et al. 2008).

As melaninas são biopolímeros heterogêneos produzidos por células especializadas chamadas melanócitos, encontradas na pele, no bulbo folicular e nos olhos. A melanogênese é responsável pela pigmentação da pele, do cabelo e dos olhos (Rato et al. 1999; Guerrero e Reiter, 2002; Slominski et al. 2005).

Apesar, da melanina, exercer importante papel na proteção contra lesão da pele causadas por raios ultra violetas (RUV), a sua produção desordenada pode levar à formação de lentigem ou manchassenis. A melanogênese ocorre no interior dos melanócitos, que são encontrados na camada basal da epiderme. A tirosinase, enzima que controla a melanogênese, é inicialmente sintetizada na superfície do retículo endoplasmático rugoso, onde é, então, transferida para o complexo de Golgi, associada ao lisossoma e, desta forma, ativada pela adição de uma cadeia de açúcar antes de ser secretada para dentro de uma vesícula. Um pré-melanossoma liberado do complexo de Golgi une-se com a vesícula para formar a unidade funcional denominada melanossoma. Nos melanossomas, a tirosinase converte a tirosina em eumelanina (preta) ou feomelanina (amarelada ou avermelhada). Dessa forma, produtos capazes de reduzir a produção de melanina, apresentam o potencial para atuarem como agentes despigmentantes (Menendez-Pelaez e Reiter, 1993; Fisher et al. 2001; 2008).

A busca por substâncias que possam retardar ou reverter o processo de envelhecimento é uma ferramenta constante de pesquisa e desenvolvimento em cosméticos e na área dermatológica. Radicais livres, como grupo superóxido e radical hidroxila são formados pelo processo de fosforilação oxidativa e causam danos aos componentes lipídicos celulares, proteínas e ácidos nucleicos, especialmente. Para tentar reverter o processo oxidativo prejudicial, um mecanismo chamado de homeostase redox, é utilizado pelas células, como defesa endógena, e consiste no equilíbrio entre a produção de radicais livres e eliminação por vários compostos antioxidantes e enzimas. Esta definição inclui a superóxido dismutase, enzimas, catalase e glutathione peroxidase, e agente redutores não enzimáticos (Helton et al. 1993; Lerchl e Schlatt, 1993).

Diante do exposto, analisar o efeito dermatocosmético de biomoléculas, destes três agentes (melatonina, extrato de esporo de *Ganoderma* e *Spirulina*) é um estudo de grande relevância, pois são substâncias naturais e já são estudadas em diferentes continentes. Salienta-se a importância como estudo para proporcionar a produção de novos dermocosméticos possíveis de serem transferidos ao setor produtivo. Um produto inovador com tais características vêm de encontro com expectativas atuais do mercado, por ser classificado como um produto *antiaging* natural.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Este trabalho tem por objetivo avaliar propriedades dermatológicas de cremes fabricados com extratos dos esporos de *Ganoderma lucidum*, extrato de biomassa de *Spirulina platensis* e melatonina.

### 2.2. ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade antioxidante do extrato do esporo de *G. lucidum* e melatonina na enzima superóxido dismutase em cultura de fibroblastos humanos.

Avaliar a capacidade despigmentante, do extrato do esporo de *G. lucidum* e melatonina sobre a atividade da enzima tirosinase.

Avaliar ação do extrato de esporo de *G. lucidum* e melatonina sobre a produção de melanina em cultura de células.

Determinar o possível potencial citotóxico *in vitro* do ATIVO de extrato de esporo de *G. lucidum* e melatonina por meio do ensaio de citotoxicidade pela técnica do MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide).

Avaliar a ação na pele humana de quatro formulações dermatocósméticas compostas com extrato aquoso de esporos de *G. lucidum*, extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* e melatonina e extrato aquoso de biomassa de *Spirulina* e melatonina.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. PELE

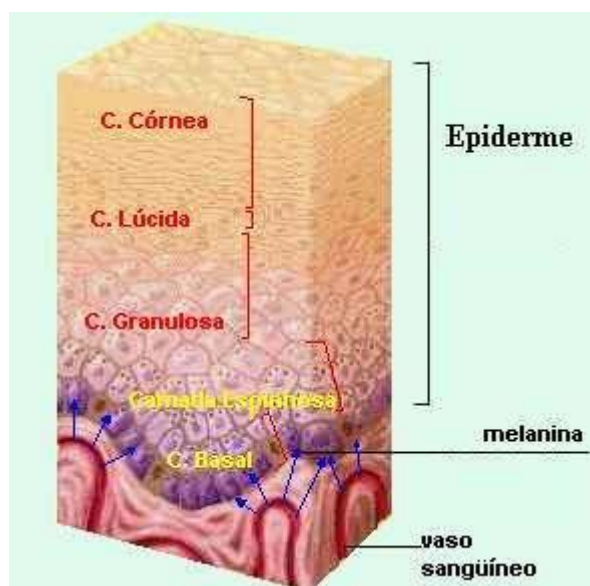
A pele de vertebrados é um importante órgão de delimitação entre o ambiente externo e interno e possui igualmente funções de proteção, sensorial, regulatórias e imunológicas.

A pele é constituída por duas camadas, dispostas em continuidade, porém, com origens embrionárias diferentes: 1- a epiderme e 2- a derme.

A epiderme é originária da ectoderme e a derme de origem mesodérmica. Esta junção dermo-epidérmica caracteriza-se por saliências e reentrâncias, denominadas papilas dérmicas. Estas se conectam com perfeição favorecendo as trocas de líquidos e substâncias da rede vascular da derme para a epiderme. A epiderme não possui vasos, apresentando apenas espaços intersticiais. Seu epitélio é estratificado (mais de uma camada) pavimentoso e queratinizado. A epiderme é constituída por células como os queratinócitos, os melanócitos e células aurófilas de *Langerhans* (Wickelgren, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013). Os melanócitos possuem origem embrionária da crista neural e produzem a melanina. As células aurófilas de *Langerhans* são células que desencadeiam os processos imunológicos da pele e são igualmente capazes de fagocitar a melanina.

A epiderme é constituída por cinco camadas distintas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida, camada córnea (Figura 1).

A derme é o tecido conjuntivo no qual se apóia a epiderme, proporcionando resistência mecânica à pele. A derme é constituída por duas camadas: a papilar (superficial) e a reticular (profunda). Na camada papilar estão presentes fibrilas de colágenos com objetivo de reforçar a adesão dermo epidérmica (Wickelgren, 2007). A camada reticular é mais espessa, apresentando mais fibras colágenas, elásticas e reticulares, responsáveis pela elasticidade da pele.



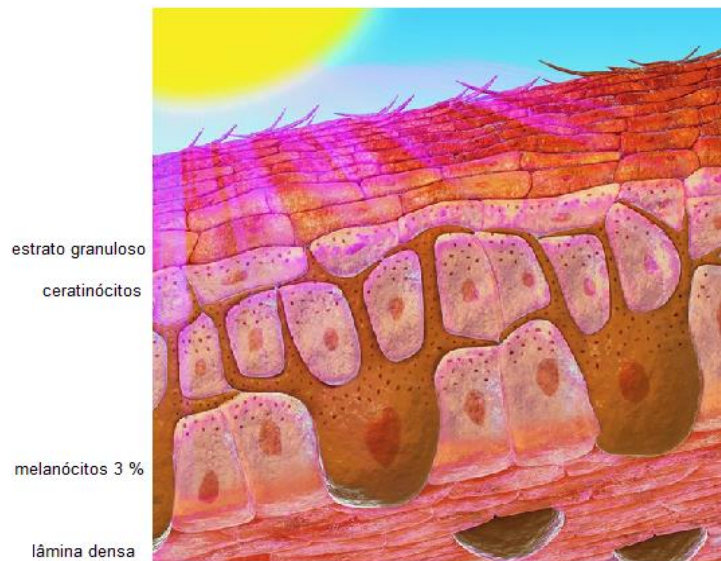
**Figura 1:** Camadas da pele e a deposição de melanina.

**Fonte:** <http://www.infoescola.com/autor/debora-carvalho-meldau/318/>

### 3.2. SÍNTESE DA MELANINA

A melanina é derivada da tirosina e é ela que confere a cor da pele em mamíferos. Sua produção é feita pelos melanócitos. A pigmentação da pele, por exemplo, é dependente da atividade melanogênica, da taxa de síntese de melanina, do tamanho e número, composição e distribuição de partículas do citoplasma dos melanócitos (Jimbow et al. 1999; Sulaimon e Kitchell, 2003; Lin e Fisher, 2007).

Os melanócitos estão localizados, na camada basal da epiderme e, ocasionalmente, na derme. Projetam seus dendritos, através da camada malpighiana, onde transferem seus melanossomos aos ceratinócitos (Figura 2). Essa associação melanócito-ceratinócito é denominada unidade epidérmico-melânica, e é constituída, nos humanos, por um melanócito e cerca de 36 ceratinócitos (Bleehen et al. 1992; Sulaimon e Kitchell, 2003; Storm et al. 2006).

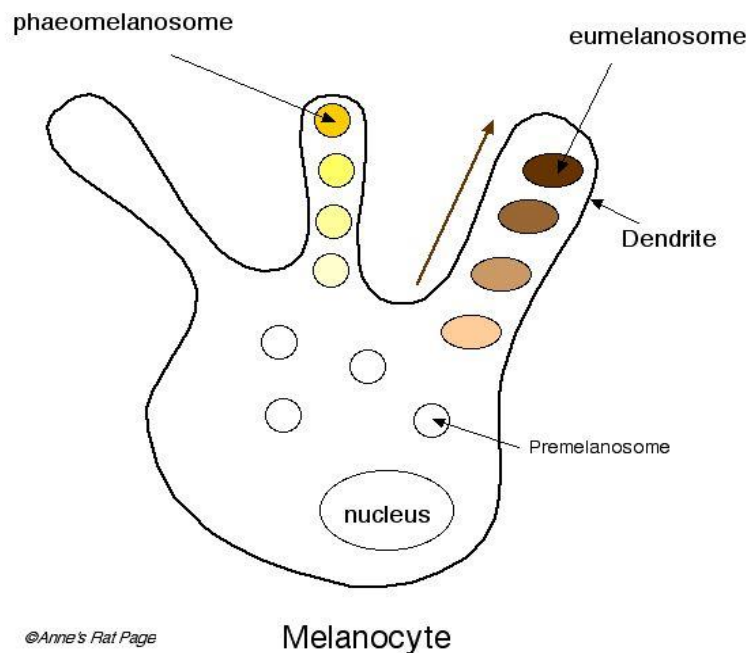


**Figura 2:** Disposição dos melanócitos na epiderme e sua inter-relação com os ceratinócitos.

**Fonte:** Adaptado de <http://www.howitworksdaily.com/q-and-a/are-melanin-and-melamine-related-in-any-way/>

Os melanócitos não estão fixos na epiderme, identificando-se apenas, pequeno desnível na posição dos melanócitos, em relação ao alinhamento da camada basal projetando-se, ligeiramente, em direção à derme (Figura 3) (Jimbow et al. 1999, Miot et al. 2009).

A quantidade de melanócitos é dependente da sua posição em relação ao corpo humano. Esta regulação exata do número de melanócitos, na epiderme parece ser mediada pelos ceratinócitos e por mediadores específicos como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) (Jimbow et al. 1999, Miot et al. 2009).

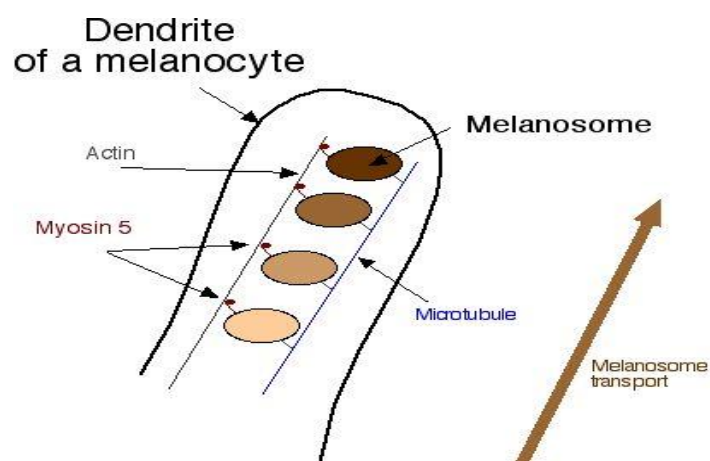


**Figura 3:** Formação dos melanócitos

**Fonte:** <http://www.ratbehavior.org/CoatColorMutations.htm>

### 3.3. MELANOSSOMAS

Melanossomas são organelas elípticas onde ocorrem síntese e deposição de melanina (Figura 4), armazenamento de tirosinase sintetizada pelos ribossomos e representam a sede dos fenômenos bioquímicos em que originam a melanina (Mosher et al. 1999).



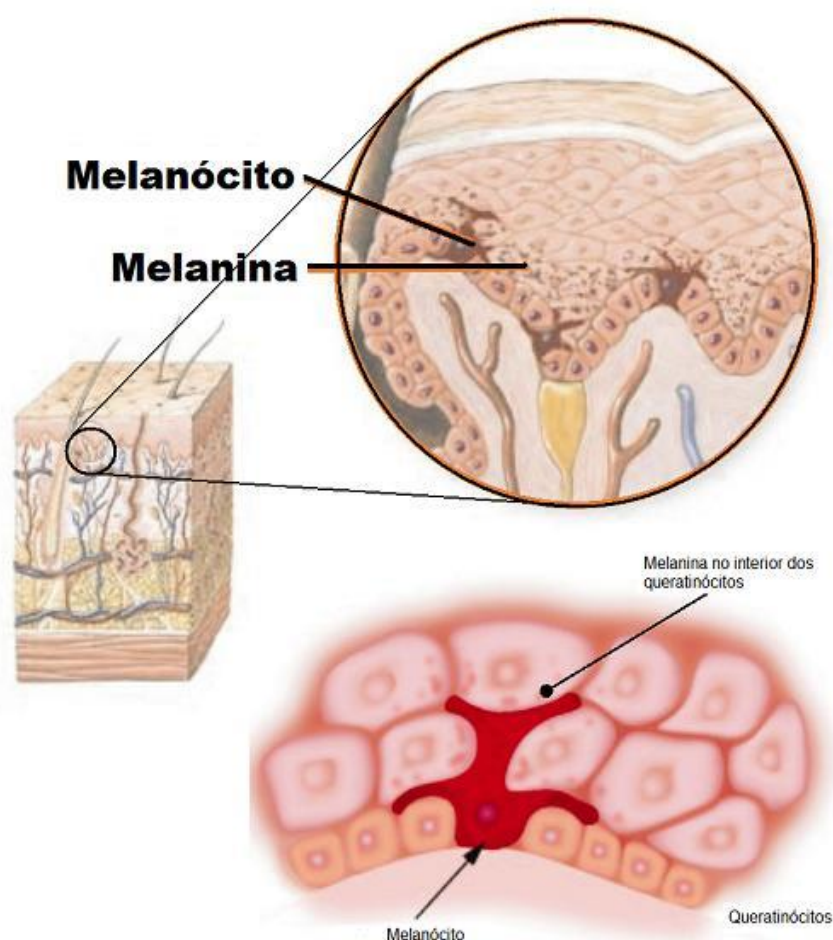
**Figura 4:** Esquema de produção e distribuição de melanina na epiderme, através dos melanossomas

**Fonte:** <http://www.ratbehavior.org/CoatColorMutations.htm>



A melanina é sintetizada nos melanossomas, que se desenvolvem em uma série de estágios (Figuras 4 e 5). As diferenças fenotípicas fundamentais entre as raças humanas com relação à pigmentação da pele não reside na produção de melanina ou no número de melanócitos, mas, na qualidade de seus melanossomas (Tabela 1). Em indivíduos negros os melanossomas são maiores e mais maduros do que em indivíduos brancos.

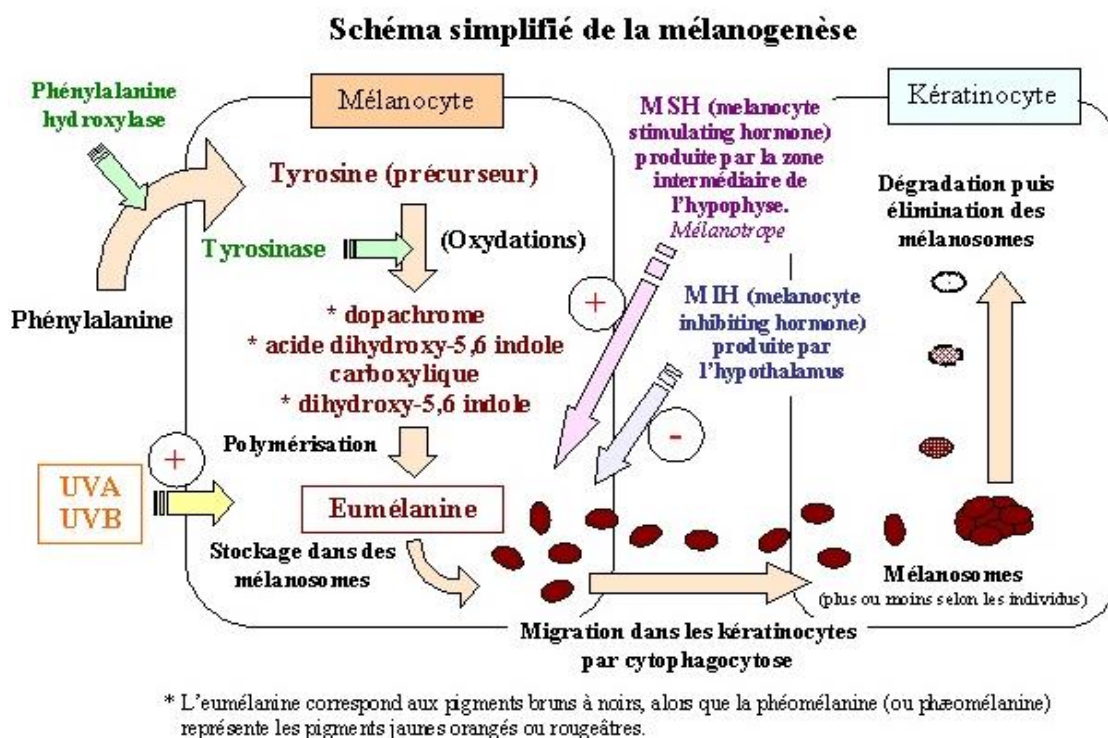
A melanina é o principal pigmento biológico envolvido na pigmentação cutânea, dando diferenças na coloração da pele. A biossíntese da melanina é iniciada com a tirosina, um aminoácido essencial. A tirosina sofre atuação química da tirosinase, complexo enzimático cúprico-proteico, sintetizado nos ribossomos e transferido do retículo endoplasmático para o Aparelho de Golgi, e são aglomerados em unidades envoltas por membrana, denominados de melanossomas (Figura 5)



**Figura 5:** Esquema ilustrativo da formação da pigmentação da pele.

**Fonte:** <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/07/23/melanina-e-melanogenese>

A melanogênese apresenta três passos distintos e importantes: o *passo inicial* é a produção de cisteinildopa, que continua tão intensa quanto for a quantidade de cisteína presente; o segundo passo é a *oxidação da cisteinildopa* para formar feomelanina - processo dependente da quantidade de cisteinildopa presente; o terceiro (e último) passo é a *produção de eumelanina*, onde somente tem início, após a maioria da cisteinildopa ser depletada (Figura 6).



**Figura 6:** Esquema mostrando as vias da melanogênese.

**Fonte:** <http://www.pharmaciedelepouille.com/depigmentants.htm>

A eumelanina absorve e dispersa a luz ultravioleta atenuando sua penetração na pele e reduzindo os efeitos nocivos do sol (Thody e Graham, 1998; Jones et al. 2002; Wagner et al. 2002).

A feomelanina tem um grande potencial em gerar radicais livres, em resposta aos RUV. Dessa forma, pode contribuir para os efeitos fototóxicos dos RUV. Em pessoas com pele clara, que possuem altas quantidades de feomelanina, apresentam risco de dano epidérmico, induzido por raios ultravioleta (Thody e Graham, 1998).

Melanócitos individuais sintetizam eumelaninas e feomelaninas. A taxa de produção das duas é determinada por um balanço da expressão de enzimas pigmentares e a disponibilidade da tirosinase e de agentes redutores específicos

na célula (Lin e Fisher, 2007). A melanina total da pele é resultante de uma mistura de monômeros de feomelanina e eumelanina e a proporção entre as duas determina a expressão fenotípica final da cor da pele e dos cabelos.

Dois tipos de pigmentação melânica são a base para a cor normal da pele:

- A cor da pele constitutiva é a cor geneticamente determinada da pele saudável, não submetida à RUV, sobre a qual desempenha um papel essencial na fotoproteção aos RUV, ao alcançar a Terra (Mosher et al. 1999; Rouzaud et al. 2005).
- A cor da pele facultativa é a cor de pele mais intensa, resultante de exposição solar ou de doenças pigmentantes.

Após a síntese completa da melanina, os melanossomas, repletos desse pigmento, são injetados no interior dos ceratinócitos, da unidade epidérmicomelânica correspondente, através dos prolongamentos dendríticos dos melanócitos (atividade citocrínica). Uma vez no interior dos ceratinócitos, os melanossomas tendem a se distribuir no citoplasma, sobre a parte superior do núcleo, de forma a protegê-lo das radiações ultravioleta. O pigmento, no interior destas células atua, também, como varredor de radicais livres fotoproduzidos, sempre no sentido de proteger o DNA celular (Boissy, 1986, 2003; Hearing, 2005).

Os eumelanossomas geralmente são produzidos na pele morena e permanecem intactos na epiderme, após exposição à RUV. Já na pele clara, nenhum melanossoma intacto pode ser detectado, após essa irradiação (Rouzaud, 2005).

A pigmentação melânica da pele humana sofre intenso controle hormonal. Em 1967, Snell resumiu o prevalente, consenso acerca da ação hormonal nos melanócitos de mamíferos, particularmente, em humanos (Klaus, 1967; Slominski, 2004).

Injeções de *melanocyte stimulating hormone* ( $\alpha$ -MSH e  $\beta$ -MSH) nos indivíduos humanos levaram a um escurecimento da pele, tanto que isso resultou na elevada melanogênese, dentro dos melanócitos epidérmicos, e aumentou o transporte dos melanossomas, derivados de melanócitos, para os ceratinócitos, sem a necessidade de exposição à RUV. A hiperpigmentação cutânea foi também observada, quando foram injetados em indivíduos humanos, com altas

doses de hormônio adrenocorticotropico (ACTH) (Jimbow, 1999; Slominsky et al. 2004; Barsh e Attardi, 2007; Wickelgren, 2007).

### 3.4. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DE PELE

Atualmente vários sistemas de classificação de pele são propostos. A classificação mais empregada é a criada por Fitzpatrick. Destaca a particularidade que tem a pele de se proteger ou se queimar a exposição aos raios ultravioleta (Quadro 1).

Esse tipo de classificação é muito útil para se determinar que tipos de pacientes estão enquadrados na margem de risco para o desenvolvimento de hiperpigmentações. Entretanto, não auxilia na determinação do tipo ou nível de lesão cutânea decorrente de foto-exposição.

A Classificação de Glogau é um sistema de classificação para a pele foto danificada, que também quantificaria o nível de lesão da pele. Este sistema tem sido útil para avaliar níveis de lesão dermo-epidérmica e enquadra a pele em quatro tipos:

*Tipo 1:* Sem rugas e vincos, foto-envelhecimento inicial, alterações suaves da pigmentação, sem a presença de queratoses, vincos mínimos, faixa etária 20-30 anos, mínimas cicatrizes de acne.

*Tipo 2:* Rugas durante a movimentação muscular, de inicial a moderado foto-envelhecimento, lentigos senis precoces visíveis, queratoses palpáveis, início do aparecimento dos vincos relacionados ao sorriso, faixa etária dos 30-40 anos, cicatrizes moderada de acne.

*Tipo 3:* Permanência de rugas no repouso muscular, visíveis discromias e telangiectasias, queratoses visíveis, foto-envelhecimento avançado, faixa etária 50 anos ou mais, presença de cicatrizes de acne que a maquiagem não cobre.

*Tipo 4:* Grave foto-envelhecimento, pele com coloração amarelo-acinzentada, rugas generalizadas, tendência à degeneração tumoral, faixa etária de 60-70 anos, cicatrizes profundas e muito aparentes devido a acnes.

**Quadro 1:** Classificação da pele proposta por Fitzpatrick

Fototipos	Características	Sensibilidade ao Sol
I Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III Morena clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV Morena moderada	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V Morena escura	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

Outro sistema de Classificação proposto é o de Mark Rubin. Esse sistema de classificação de pele correlaciona-se a profundidade histológica com as alterações clínicas visíveis. A classificação propõe três tipos de pele:

*Nível 1:* Os sinais clínicos surgem devido a alterações da epiderme tão somente. As maiores anormalidades decorrem de alterações de pigmentação e textura. Exemplifica-se com casos de efélides, lentigos e superfície rugosa devido ao aumento da espessura da camada córnea.

*Nível 2:* Os sinais clínicos decorrentes de alterações da epiderme e derme papilar geralmente estão relacionados com alterações de pigmentação. Estes pacientes possuem aumento do enrugamento cutâneo, notadamente na região periorbitária e lateral ao sulco nasogeniano, onde se mostra atrófica.

*Nível 3:* Os sinais clínicos são decorrentes a alterações da epiderme, derme papilar e derme reticular. Esta é uma forma mais avançada de lesão por foto-exposição, o paciente apresenta um enrugamento intenso, comumente associado a um quadro de couro enrugado, com coloração amarelada da pele.

### 3.5. GANODERMA LUCIDUM

*Ganoderma lucidum* é um basideomiceto pertencente à família Polyporaceae (Figura 7). O nome deriva do grego *ganos*/γανος "brilho", "brilhante" e *derma*/δερμα "pele", enquanto o epíteto específico do latim *lucidum* significa "brilhante". Uma outra designação japonesa é *mannentake*), que significa "cogumelo dos 10.000 anos" (Liddell e Scott, 1980).

Este fungo parece ser um complexo de espécie, com grande variedade de tipos (Hseu e Wang, 1996). *Ganoderma lucidum* ocorre em duas formas de desenvolvimento. Uma, encontrada na América do Norte, é sésil, relativamente grande com pé pequeno ou inexistente, enquanto a outra é mais pequena e com pé longo e delgado, sendo encontrada sobretudo nos trópicos. Contudo, muitas formas de crescimento são intermediárias, ou exibem morfologias muito pouco usuais (Arora, 1986) levantando a possibilidade de que se trate de espécies distintas.

As condições ambientais parecem interferir nas características morfológicas do fungo. Concentrações elevadas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) resultam na elongação do pé. Outras formas apresentam "antenas", sem chapéu e estas podem ser igualmente afetadas pelas concentrações de dióxido de carbono.



**Figura 7:** *Ganoderma lucidum*.

**Fonte:** [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Ganoderma\\_lucidum\\_01.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/81/Ganoderma_lucidum_01.jpg)



*Ganoderma lucidum* produz metabólitos triterpenos, chamados ácidos ganodéricos, os quais têm uma estrutura molecular semelhante à dos hormônios esteróides (Paterson, 2006).

*Shen Nong* no seu *Pen Ts'ao Jing*, um antigo texto medicinal chinês com 2000 anos diz que "o sabor é amargo, a sua energia neutra, não tem toxicidade. Cura a acumulação de fatores patogênicos no peito. É bom para o Qi da cabeça, incluindo actividades mentais. O consumo em longo prazo deixa o corpo mais leve; nunca envelhecerás. Prolonga os anos (Sullivan, 2002) um livro médico chinês denominado de "O Bencao Gangmu", publicado no século XVI, mostra também uma possível ligação entre a pesquisa moderna e o conhecimento popular ao descrever este cogumelo: "Afeta positivamente o Qi do coração, reparando a zona peitoral e beneficiando aqueles que têm um peito congestionado. Tomado ao longo de grande período de tempo mantém a agilidade do corpo, e os anos são prolongados...(Bone, 2007).

Usos terapêuticos conhecidos para *G. lucidum* são atividades antitumorais, imunomoduladoras e imunoterapêuticas, tendo em conta estudos sobre polissacarídeos, terpenos e outros compostos bioactivos isolados dos corpos frutíferos e micélios (Paterson, 2006, 2008; Lindequist et al.2005). Também é conhecida a ação inibitória da agregação de plaquetas, e ação anti hipertensão (por inibição da enzima conversora da angiotensina), anti colesterol, e anti glicemia (Bensky et al. 2004). Estudos laboratoriais demonstraram efeitos anti-neoplásicos. Em estudo experimental em animal de laboratório foi relatado que *Ganoderma* preveniu a formação de metástases,<sup>[14]</sup>

Os mecanismos pelos quais *G. lucidum* pode inibir células cancerígenas são: (1) ativação/ modulação da resposta imune do hospedeiro, (2) citotoxicidade direta nas células cancerígenas, (3) inibição da angiogênese induzida pelo tumor, (4) inibição do comportamento metastático tumoral, e (5) desativação da carcinogenese (Boh, 2012).

Estudos adicionais, em ratos, indicam que ácido ganodérico pode ajudar a fortalecer o fígado contra danos provocados por vírus e outros agentes tóxicos, sugerindo um benefício potencial deste composto na prevenção doenças do fígado em humanos (Lee e Wang, 2006) e esteróis obtidos de *Ganoderma* inibem a actividade da lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase na biossíntese do colesterol (Hajjaj et

al. 2006). Compostos de *Ganoderma* inibem a atividade da 5-alfa redutase na biossíntese de dehidrotestosterona (Liu et al. 2006).

Recentes publicações apontam para o efeito hipoglicemiante de polissacarídeos de *G. lucidum*. Ratos diabéticos foram alimentados com polissacarídeos de *G. lucidum* e verificou-se um decréscimo no nível sérico de glicose, insulina e peso corporal. Níveis hepáticos de RNA mensageiro (RNAm) de glicogênio fosforilase, frutose 1-6 bifosfatase, fosfoenolpiruvato carboxikinase e glicose-6 –fosfato foram dosados por reação em cadeia da polimerase (PCR). Os mesmos encontraram-se significativamente diminuídos.

O decréscimo da expressão RNAm de diversas enzimas-chaves envolvidas na gliconeogênese e na glicogenólise, leva a um futuro promissor de possível aplicabilidade clínica dos polissacarídeos de *G. lucidum* (Xiao et al. 2012).

Em estudo duplo cego randomizado, *G. lucidum* foi utilizado em pacientes com artrite reumatoide. Os pacientes obtiveram melhora dos sintomas algícos, na vigência da crise, quando comparados aos do grupo controle (Li et al. 2007). Verificou-se a capacidade de *G. lucidum* promover a inibição de citocinas inflamatórias em fibroblastos sinoviais, em portadores de artrite reumatóide. A inibição é, em parte, dada pela via de transcrição do fator nuclear kappa B (NF-kappa B) (Ho et al. 2007).

A sua ação imunoregulatória também já foi descrita. Em modelo animal, após indução de imunocomprometimento, por injeção intraperitoneal de ciclosporina, foram avaliados a expressão dos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-4, IFN- $\gamma$  por testes imunoenzimáticos (ELISA). Avaliou-se também RNAm de TNF- $\alpha$  no baço e timo, por PCR. Verificou-se que no grupo suplementado com óleo dos esporos de *G. lucidum* um aumento significativo da expressão das interleucinas, quando comparado ao grupo controle (Yi et al. 2012).

Estudos recentes demonstram que polissacarídeos de *G. lucidum* aceleram a cicatrização de feridas em ratos com diabetes tipo I. O meio de ação é por inibição do estresse oxidativo mitocondrial. A condição de diabetes aumenta consideravelmente o superóxido mitocondrial, a formação de nitrotirosina. Tais condições foram normalizadas frente a suplementação de polissacarídeos de *G. lucidum*. Esse também reduziu a expressão da enzima



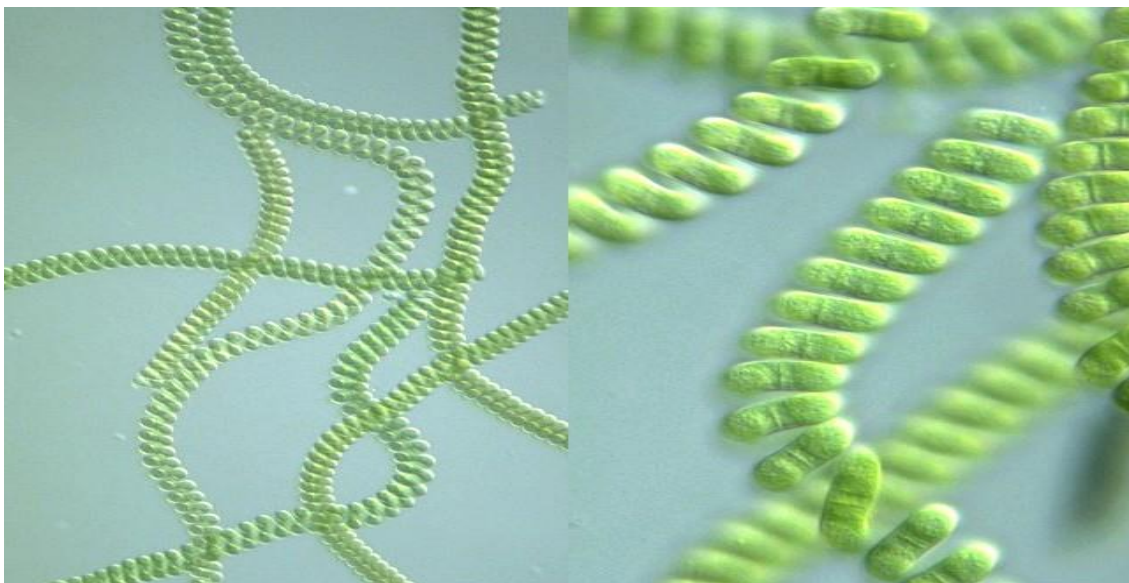
p66Shc (Tie et al. 2012). Inibidores da tirosinase são componentes eficazes no clareamento de pele. Extrato do *G. lucidum* apresentaram efeito significativo na inibição da tirosinase, atentando-se para a possibilidade da sua ação no mercado de dermocosméticos (Chien et al. 2008).

Polissacarídeos extraídos do corpode frutificação de *G. lucidum* foram sulfatados e carboximetilados. O efeito em radicais livres e sua ação imunomoduladora foram estudados. Os dois derivados foram injetados por via intraperitoneal com ou sem 5-fluorouracil (agente imunodepressor), ao longo de sete dias, em ratos BALB/C. Os derivados de polissacarídeos promoveram um aumento do timo e do baço. Ao mesmo tempo, melhoraram a superóxido dismutase e o conteúdo de glutatona peroxidase (Wang et al. 2012).

### 3.6. *SPIRULINA PLATENSIS*

*Spirulina* é uma microalga com filamentos em espiral (Figura 8). É formalmente chamada *Arthrospira*, que pertence à classe de cianobactérias com capacidade fotossintética (Sapp, 2005; Komárek e Hauer, 2009). *Spirulina* foi inicialmente classificada no reino vegetal devido à sua riqueza em pigmentos, bem como sua capacidade de fotossíntese. Mais tarde, foi classificada no reino bactérias com base no novo entendimento sobre sua genética, fisiologia e propriedades bioquímicas (Vonshak, 1997).

*Spirulina* cresce naturalmente em águas alcalinas, de temperatura tropicais e subtropicais, incluindo áreas das Américas, Ásia e da África Central (Vonshak, 1997; Gershwin e Belay, 1998). Existe um grande número de espécies de *Spirulina*. Porém, três são mais estudadas devido ao seu potencial terapêutico e seus efeitos nutricionais, incluindo *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *Spirulina maxima* (*Arthrospira maxima*) e *Spirulina fusiformis* (*Arthrospira fusiformis*) (Vonshak, 1997; Gershwin e Belay, 1998, Karkos et al. 2008).



**Figura 8:** Fotomicrografia da microalga *Spirulina*

**Fonte:** <http://www.bio-natur-ekonet.eu/zaujimavosti-informacie/o-mikroriasach/spirulina-platensis/>

Há relatos do consumo de *Spirulina* há mais de 400 anos. Povos no México como os Maias, Toltecas e Kanembu durante a civilização asteca já consumiam *Spirulina* (Ciferri e Tiboni, 1985). Também tem sido consumida ao longo dos séculos na África Central (Abdulqader et al. 2000). O valor nutricional da *Spirulina* é bem reconhecido a dado seu elevadíssimo teor proteico (60-70% em peso seco) e a sua riqueza em vitaminas, minerais, ácidos graxos essenciais (Vonshak, 1997; Gershwin e Belay, 1998). Por seus altos valores nutricionais, a Instituição Intergovernamental contra a desnutrição (IIMSAM) elegeu a *Spirulina* como arma no combate à fome e desnutrição mundial (Habib et al. 2008). Além disso, devido a seu poder nutricional, *Spirulina* foi recomendada tanto pela National Aeronautics and Space Administration (NASA) quanto pela Agência Espacial Europeia (ESA) como um dos alimentos primários durante missões espaciais de longo prazo.

A partir dos anos 80, grandes esforços e investigações foram feitos para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos ou alimentos funcionais com objetivo de prevenção ou gestão de várias doenças.

*Spirulina* tornou-se um dos alimentos nutracêuticos, com diversos efeitos benéficos sobre uma variedade de doenças. Tem sido relatado que o consumo de *Spirulina*, como suplemento na dieta, tem efeitos benéficos na prevenção ou gestão de hipercolesterolemia, hipergliceridemia, certas doenças inflamatórias,

alergias, câncer, infecções virais, doenças cardiovasculares, doenças metabólicas, dentre outros (Khan et al. 2005; Kulshreshtha et al. 2008)

### 3.6.1 Efeitos Antioxidantes e Anti-Inflamatórios da *Spirulina*

*Spirulina* contém vários ingredientes ativos como a ficocianina e  $\beta$ -caroteno. Tais princípios possuem potente ação antioxidante. Estas foram relatadas pela primeira vez em 1998 (Romay et al. 1998 a,b) e confirmadas por numerosos estudos depois (González et al. 1999; Romay et al. 2001,2003; Ramirez et al. 2002 a,b; Khan et al. 2006; Patel et al. 2006; Riss et al. 2007, Cherng et al. 2007; Shih et al. 2009; Manconia et al. 2009).

Ficocianina tem a capacidade de sequestrar radicais livres. Além disso, diminui a produção de nitritos, suprime a óxido nítrico sintetase (iNOS), e inibe a peroxidação lipídica microsomal de fígado (González et al. 1999; Romay et al. 2001,2003; Ramirez et al. 2002 a,b; Khan et al. 2006; Patel et al. 2006; Riss et al. 2007, Cherng et al. 2007; Shih et al. 2009; Manconia et al. 2009). Como as atividades anti-inflamatórias, ficocianina inibe a formação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF $\alpha$ , suprime a expressão ciclooxigenase-2 (COX-2) e diminui a prostaglandina E (Romay et al. 2001; Ramirez et al. 2002; Patel et al. 2006; Riss et al. 2007; Komárek e Hauer, 2009). Outro princípio ativo de *Spirulina*, o  $\beta$ -caroteno, tem sido relatado como antioxidante e anti-inflamatório (Schafer et al. 2002; Bai et al. 2005; Katsuura et al. 2009). Em estudo para comparar  $\beta$ -caroteno, vitamina E e o óxido nítrico, verificou-se que  $\beta$ -caroteno protege contra a peroxidação lipídica (Schafer et al. 2002).

Estudos também mostraram que o  $\beta$ -caroteno inibiu a produção de óxido nítrico e prostaglandina E, e ainda suprimiu a expressão de iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Komárek e Hauer, 2009). Tal supressão de mediadores inflamatórios por  $\beta$ -caroteno é resultante da inibição da ativação do NF- $\kappa$ B, por meio do bloqueio de translocação nuclear de NF- $\kappa$ B na subunidade p65. Além disso,  $\beta$ -caroteno suprimiu a transcrição de citocinas inflamatórias incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12 (Schafer et al. 2002; Bai et al. 2005; Katsuura et al. 2009).

O efeito da suplementação de *Spirulina*, na prevenção de lesões musculoesqueléticas em não atletas foi testado. Os resultados mostraram que concentrações plasmáticas de malondialdeído (MDA) foi significativamente

diminuída no grupo suplementado. Injúrias musculoesqueléticas devido à peroxidase e desidrogenase láctica foram estatisticamente menores no grupo tratado. Além disso, o tempo de exaustão foi maior no grupo tratado com *Spirulina*. Esses resultados sugerem que a ingestão de *Spirulina platensis* mostra um efeito preventivo nas lesões musculoesqueléticas de atletas (Lu et al., 2006).

A suplementação de *Spirulina* foi testada visando avaliar se a mesma melhora o desempenho na realização de atividade física. Verificou-se que o tempo para a fadiga muscular após a realização de 2h foi significativamente maior após a suplementação com *Spirulina*. Além disso, verificou-se que a ingestão de *Spirulina* reduziu significativamente a taxa de oxidação de carboidratos e aumentou a taxa de oxidação de gordura em comparação com o grupo que tomou apenas placebo. Níveis de glutatona redutase foram superiores após a suplementação com *Spirulina* em comparação com o placebo, em repouso e 24h após exercício. Os autores concluíram que a suplementação com *Spirulina* induziu aumento significativo na capacidade de exercício, a oxidação da gordura e a concentração de glutatona redutase (Kalafati et al. 2010).

Sabe-se que *Spirulina* age como hipoglicemiante. O mecanismo de ação no metabolismo lipídico ainda não é bem compreendido. Nagaoka et al. 2005 relataram que concentrado de *S. platensis*, inibia absorção jejunal de colesterol, e inibia a reabsorção no íleo de bile. Propondo, portanto, que C-ficocianina é a molécula responsável por esse efeito.

Torres-Durán et al. 2012 avaliaram efeitos da *Spirulina maxima* na lipemia pós-prandial e em jejum em jovens atletas. Os indivíduos consumiram 5 g de *Spirulina*, durante 15 dias. Antes e depois do tratamento com *Spirulina*, eles consumiram (12 h em jejum) uma refeição padronizada com elevado teor de gorduras (53,2% de calorias totais). Foi medida a lipemia pós-prandial em tempos de 1,5, 3, e 4,5 horas após a refeição gordurosa. As concentrações de triacilgliceróis foram significativamente menores após a suplementação com *Spirulina*.

Pacientes HIV desenvolvem anormalidades no metabolismo da glicose devido ao vírus e ao tratamento anti-retroviral. Um grupo de pacientes foi suplementado com *S. platensis*. Após receberem 19 g/dia de suplementação, houve um aumento na sensibilidade de insulina em 224,7% no grupo que ingeriu

*Spirulina* em 8 semanas. Esse estudo piloto sugere que a sensibilidade à insulina em pacientes portadores de HIV pode ser melhorada com a suplementação de *Spirulina* (Simpore et al. 2005).

Avaliações do efeito da *Spirulina* têm sido feitas com relação ao colesterol. Níveis de colesterol total e colesterol LDL aumentam com a idade (Heiss et al. 1980; Abbott et al. 1983), tal como o faz a incidência de doenças cardiovasculares (Castelli et al. 1980). Três estudos clínicos foram realizados para investigar os efeitos terapêuticos da *Spirulina* em população de idosos (Park et al. 2003; Kim et al. 2005; Park et al. 2008). Em estudo com 12 pacientes (6 homens e 6 mulheres) com idades entre 60 e 75 (Park et al. 2003), os pacientes receberam um suplemento de *Spirulina* na dose de 7,5 g/dia durante 24 semanas. As concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total e fração LDL foram reduzidos após 4 semanas de suplementação.

Outro estudo incluiu 26 mulheres idosas com mais de 60 anos com quadro de hipercolesterolemia (colesterol total acima de 200 mg/dl). A ingestão de *Spirulina* na dose de 7,5 mg / dia por 8 semanas, resultou numa redução significativa dos níveis séricos de colesterol total, colesterol LDL e LDL oxidado. Além disso, os níveis de apolipoproteína B também diminuíram (Kim et al. 2005).

O ensaio clínico mais recente foi um estudo randomizado, duplo-cego e controlado com placebo (Park et al. 2008). Setenta e oito indivíduos entre os 60 e 87 anos foram divididos aleatoriamente em grupo estudo ou grupo de placebo. Após o consumo de *Spirulina* na dose de 8 g/dia durante 16 semanas, o colesterol total do plasma e a fração LDL foram significativamente reduzidos. Os dados desses ensaios clínicos indicam que a suplementação com *Spirulina* poderia ser benéfica para o gerenciamento de alterações do envelhecimento.

Existem vários relatos sugerindo que *Spirulina* pode ter um efeito benéfico na prevenção de doenças cardiovasculares (Steinberg, 1997; Dhalla et al. 2000; Chisolm e Steinberg, 2000; Chisolm e Steinberg, 2000; Lusis, 2000; Yung et al. 2006). Observa-se resultados de estudos sobre os efeitos da dieta suplementada com *Spirulina* sobre a reatividade de vaso motora de anéis de aorta excisados tanto de ratos magros quanto obesos. Também reafirmou-se resultados preliminares sobre os efeitos da ingestão de *Spirulina* na redução de lipídios plasmáticos e pressão arterial em humanos. Os resultados dos estudos anteriores sugerem fortemente que a *Spirulina*, induz um aumento relacionado com a

síntese/libertação de óxido nítrico pelo endotélio, bem como um aumento na síntese/libertação de um vasodilatador dependente de ciclo oxigenase e/ou uma diminuição na síntese/libertação de um vasoconstritor e icosanóides pelo endotélio. Em humanos, a ingestão de *Spirulina* diminui a pressão sanguínea e as concentrações de lípidos no plasma, especialmente os triacilgliceróise, lipoproteínas e do colesterol de baixa densidade de LDL.

A pele é uma barreira que protege os tecidos lesionados, sendo assim a regeneração da pele é um dos problemas médicos de maior relevância. A engenharia de tecidos é uma abordagem que possibilita regenerar tecidos perdidos. No entanto, a cultura de tecido tridimensional envolve ambientes de estresse devido a várias razões, tais como a massa ou o transporte de gás e a alta densidade de células. *Electrospun* tem sido amplamente utilizada como uma matriz extracelular natural. Avaliou-se a embebição com *Spirulina* nas nanofibras de um tecido de pele artificial. Provou-se que a *Spirulina* afetou positivamente a viabilidade e proliferação de fibroblastos, e ausência de citotoxicidade local (Jung et al. 2012).

### 3.7. MELATONINA

Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido por diversos animais e plantas (Caniato et al. 2003). Em mamíferos, a melatonina é produzida na glândula pineal (Reiter, 1991), assim como no cérebro, retina, glândula de Harder, corpo ciliar, no timo, no epitélio das vias respiratórias, na medula óssea, células do sistema imunológico, gônadas, placenta, trato gastrointestinal e pele. A melatonina circulante deriva predominantemente da glândula pineal, que por difusão entra na circulação (Slominski et al. 2012).

Quimicamente, é uma indolamina sintetizada a partir do triptofano (aminoácido essencial encontrado nas proteínas). Devido ao seu caráter anfifílico, pode atravessar facilmente as membranas celulares por difusão. Em consequência, a melatonina não é armazenada no interior da glândula. É imediatamente liberada dentro dos capilares sanguíneos que irrigam a glândula pineal após a sua formação. Assim, a secreção de melatonina depende de sua síntese, que é catalisada por quatro enzimas distintas: triptofano hidroxilase

(TPH), descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos, N-acetiltransferase (NAT) e hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT).

A melatonina é descrita como um mediador neuroendócrino com bioatividades pleiotrópicas tais como de um hormônio, neurotransmissor, imunomodulador e modificador biológico (Slominski et al. 2005; Wang e Wang, 2006).

A melatonina participa na organização temporal dos ritmos biológicos, atuando como mediadora entre o ciclo ambiental claro/escuro e os processos regulatórios fisiológicos, incluindo a regulação endócrina da reprodução, a regulação dos ciclos de atividade-reposo e sono/vigília assim como a regulação do sistema imunológico. Em humanos, a melatonina tem sua principal função em regular o sono. Ou seja, em um ambiente escuro e calmo, os níveis de melatonina do organismo aumentam, causando o sono. Outra função atribuída à melatonina é a de antioxidante, agindo na recuperação de células epiteliais expostas a radiação ultravioleta (Wang e Wang, 2006) e, através da administração suplementar, ajudando na recuperação de neurônios afetados por doença de Alzheimer (Slominski et al. 2005) e por episódios de isquemia (como os resultantes de acidentes vasculares cerebrais) (Reiter et al. 2005).

Nas últimas décadas de investigações relativas à ocorrência de melatonina em diferentes compartimentos corporais verificou-se que elevadas concentrações de melatonina foram encontrados no fluido biliar, na medula óssea, no fluido cerebrospinal, no ovário, no olho, em linfócitos e na pele (Fischer et al. 2006). Sua ampla distribuição extracelular e intracelular pode explicar a complexidade e pluripotencialidade do papel da melatonina em uma variedade de processos fisiológicos através de diferentes mecanismos de ação (Reiter et al. 2005).

A melatonina parece ser responsável pela homeostase mitocondrial ou o equilíbrio do cálcio intracelular. Dessa forma alguns estudos avaliaram disfunções mitocondriais simultaneamente correlacionando à prevenção da doença de Alzheimer, doença de Parkinson, o envelhecimento, a epilepsia, e disfunções mitocondriais (Acuña-Castroviejo et al. 2001).

Parte da capacidade antioxidante da melatonina é devido à regulação da expressão de genes que regulam atividade de numerosas enzimas antioxidantes tais como glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), Mn superóxido-

dismutase (Mn-SOD) e Cu/Zn- superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD). Além disso, a melatonina não atua apenas como um antioxidante potente, mas também é capaz de ativar outras enzimas endógenas envolvidas em mecanismos antioxidantes contra o estresse oxidativo.

Além disso, de acordo com Tan et al. (2001) metabólitos estruturais da melatonina, tais como N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) ou N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), formado durante o seu metabolismo enzimático no cérebro, são também descritos como eficientes para oxigênio reativo ROS e das espécies de nitrogênio reativo (RNS).

Fatores exógenos como xenobióticos (Kleszczynski et al. 2009) bem como vários tipos de radiação, como as ionizantes e ultravioletas, são geradores de espécies de oxigênio reativo. Além disso, radiações ultravioletas geram formação de radicais livres. Os mesmos provocam danos importantes quer seja nas estruturas intra e extracelulares. Provou-se também que há danos nos lípideos, nas membranas fosfolipídicas, nos ácidos nucleicos e nas proteínas (Shindo et al. 1994).

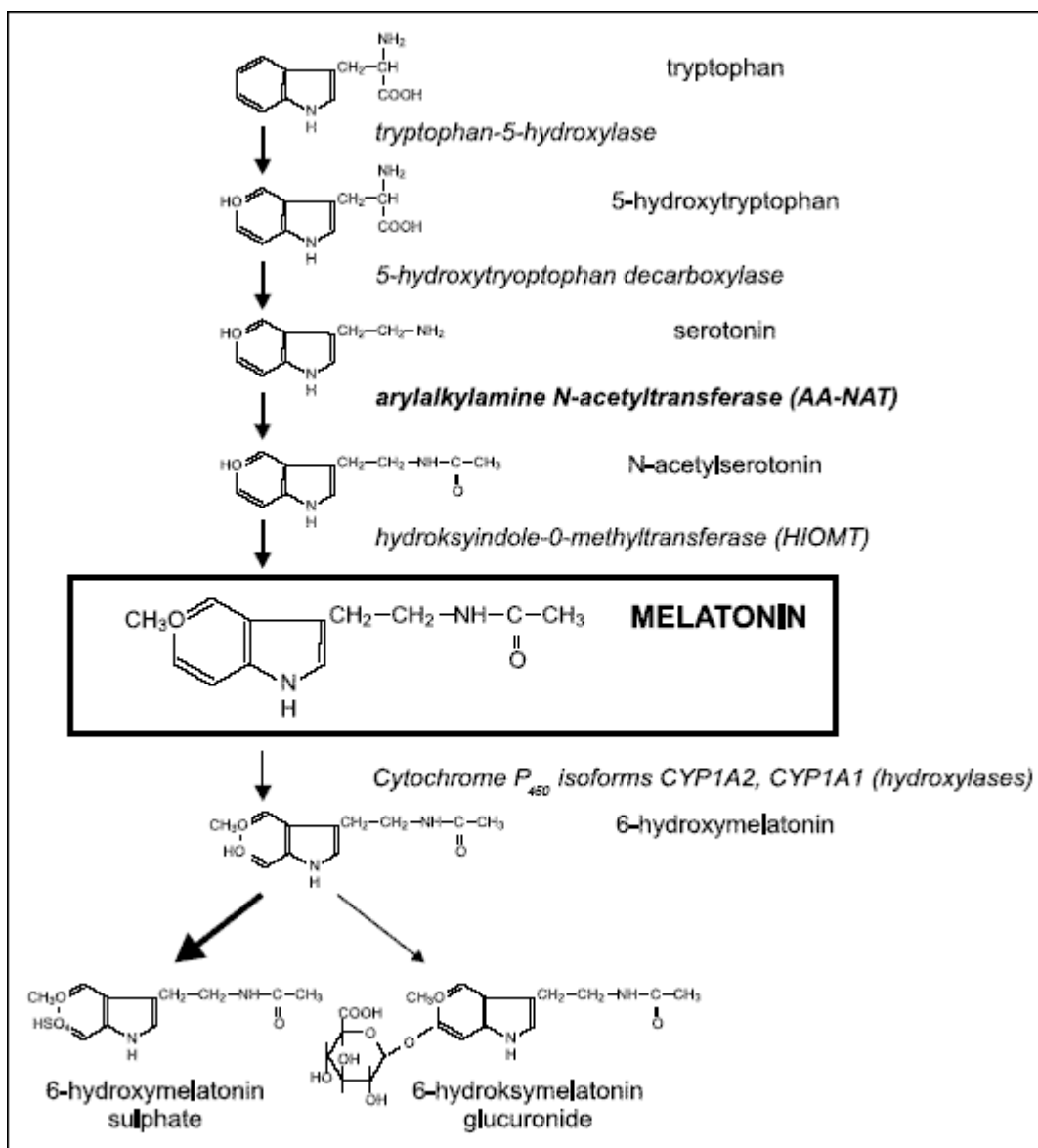
Algumas pesquisas sobre melatonina puderam confirmar que, tanto as vias biossintéticas e as vias biodegradativas de melatonina foram encontradas nas células da pele (Slominski et al. 2002).

O composto mais importante para a síntese da melatonina intracutânea (Figura 9) é o aminoácido essencial triptofano (Trp), que é convertido pela triptofano hidroxilase (TPH) de 5-OH-Trp e após a serotonina devido à atividade da descarboxilase dos aminoácidos aromáticos (AADC), que está disponível em quase todos os tecidos (Slominski et al. 2002; Fischer et al. 2008). Em seguida, a acetilação da serotonina ocorre a formação de N-acetylserotonin (NAS) catalisada por uma N-aril-alquilamina acetiltransferase (AANAT) e/ou arilamina N-acetiltransferase (NAT). Finalmente, NAS produzida na pele pode ser liberada para a circulação ou permanecer no tecido cutâneo e, posteriormente, poderia ser transformada em melatonina após a ação da hidroxiindol-O-metiltransferase (HIOMT) (Conti et al. 2000; Slominski et al. 2002).

A RUV é o fator ambiental mais patológico à pele. A mesma afeta diretamente a função de várias células na pele, incluindo queratinócitos, melanócitos e leucócitos, assim como as células de Langerhans. Além de resposta aguda resultando na formação de células queimadas, a RUV induz a



geração de espécies reativas de oxigênio. A melatonina inibe eficazmente estas reações inflamatórias (Fischer et al. 2006, 2008).

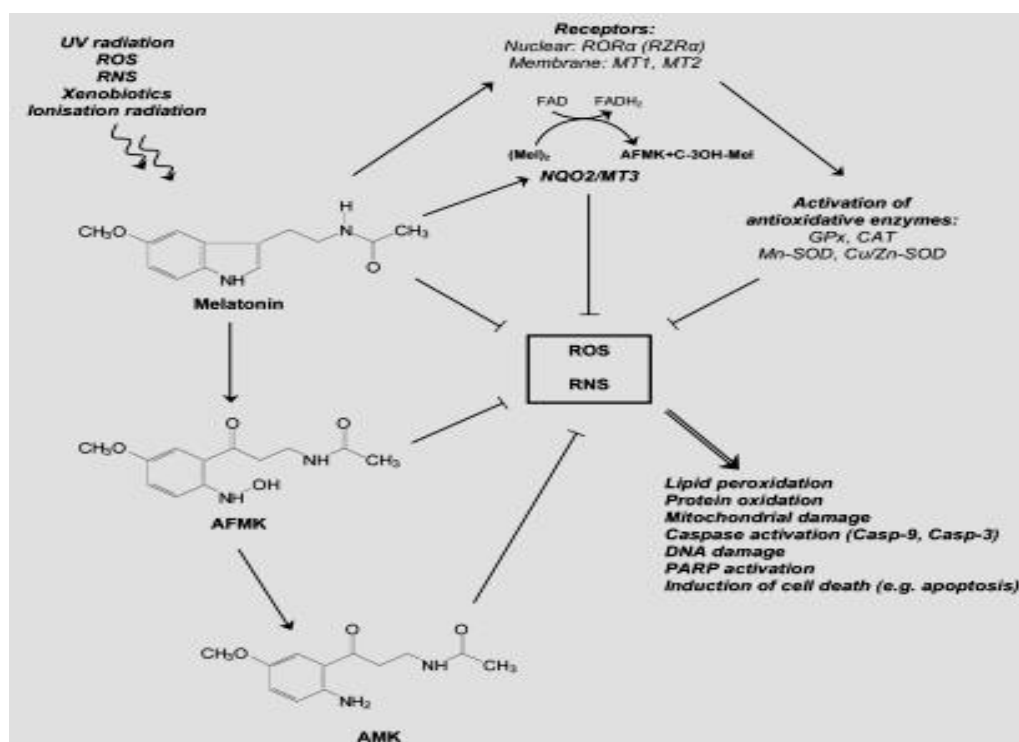


**Figura 9:** Via de biossíntese da melatonina na pele. A melatonina é sintetizada a partir de triptofano numa cascata de reacções enzimáticas catalisadas pela triptofanohidroxilase (TPH), descarboxilase do ácidoamino (AAD), HIOMTarilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT), arilamina N-acetiltransferase (NAT) ehidroxiindol-O-metiltransferase.

**Fonte:** [www.Jpg.krakow.pl](http://www.Jpg.krakow.pl)

Existem duas ações antioxidantes da melatonina: uma ligação direta, devido à sua capacidade para atuar como um eliminador de radicais livres, e uma indireta devido à expressão de genes e regulação das enzimas antioxidantes principais. A função antioxidante direta usa as propriedades físico-químicas de melatonina. Assim, tal como uma molécula rica em elétrons, a melatonina é capaz de interagir com as várias formas de radicais livres, tais como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\bullet$ , o anion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), o anion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e um radical peróxido ( $\text{LOO}^\bullet$ ).

O segundo mecanismo de ação antioxidante da melatonina é desenvolvido através da ativação de enzimas antioxidantes (Figura 10).



**Figura 10:** Resposta da melatonina induzida por estresse oxidativo. A melatonina e os seus metabólitos AFMK e / ou AMK são produzidos com objetivo de proteger contra o dano oxidativo por eliminação de ROS (atividade direta) ou por aumento da expressão anti-oxidante principal.

Pablos et al. 1995, observaram proporção diferente de atividade destas enzimas, particularmente em vários tecidos, dependente da taxa de acumulação de melatonina exógena. Com base nestas observações, é provável que a

melatonina possa regular a expressão do gene CAT ou SOD e atividades no estresse oxidativo induzido por radiação UV na pele.

De acordo com investigações realizadas por Ryoo et al. 2001, em fibroblastos expostos por RUV, apenas 56% das células sobreviveram após exposição UV (140 mJ/cm<sup>2</sup>). Quando essas células foram pré-incubadas com 1 nmol de melatonina mostrou taxa de sobrevivência de células de 92,5%. Observou-se ainda uma diminuição significativa da peroxidação lipídica e morte celular. Experimentos comparativos utilizando fibroblastos UV-tratados mostraram correlação semelhante da viabilidade celular na presença de melatonina a 100 nmol.

A epiderme, derme e anexos, são alvos de regulação da melatonina (Slominski et al. 2005a; Fischer et al. 2008a; Slominski et al. 2008a). A melatonina está envolvida na regulação do ciclo de crescimento de cabelo, pigmentação cutânea, bem como fisiologia da pele e suas patologias. Entre as patologias estão o vitiligo e melanomas (Slominski et al. 1989; Schallreuter et al. 2008a).

O campo de crescimento do cabelo foi o tema de uma pesquisa realizada na Austrália e na Nova Zelândia, onde os experimentos em animais cobertos de pele revelou que a melatonina estimula o crescimento do cabelo. Por exemplo, a dieta suplementada com a melatonina aumentou a taxa de crescimento do cabelo na primavera (Welch et al. 1990; Nixon et al. 1993; Ibraheem et al. 1994). É provável que o crescimento de pele seja mediado por receptores de melatonina, uma vez que estes são expressos na pele de roedores (Slominski et al. 1994; Slominski et al. 2004b; Kobayashi et al. 2005).

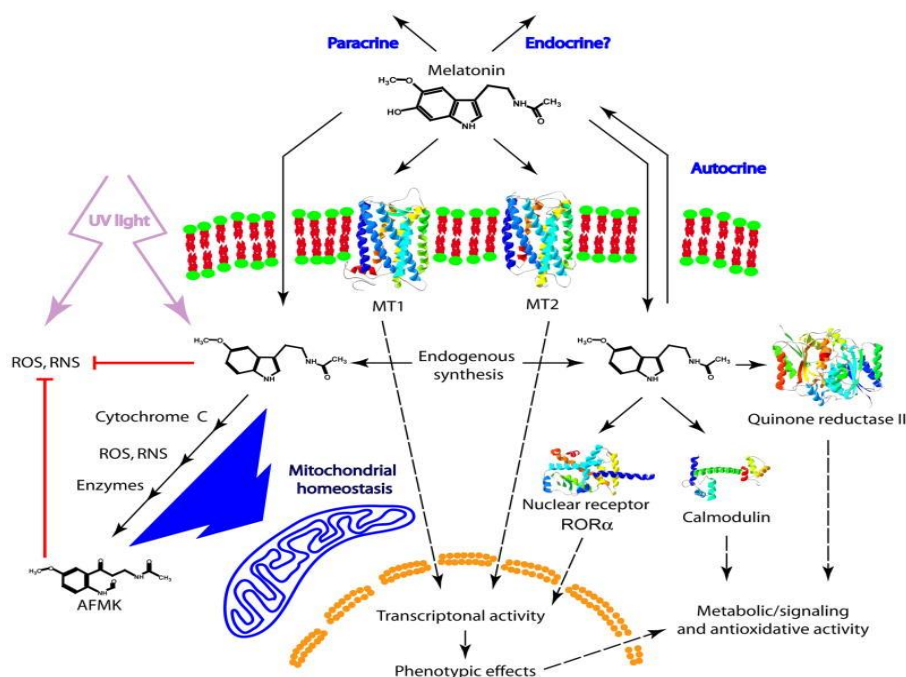
Fischer e colaboradores estipularam ensaio clínico em mulheres com alopecia androgenética. O estudo mostrou efeito positivo da melatonina sobre o crescimento do cabelo humano, sugerindo-a como um potencial regulador de crescimento de cabelo em seres humanos (Fischer et al. 2004).

A MT1 representa a forma predominante do receptor de melatonina encontrada em toda a pele e as células cultivadas (Slominski et al. 2003 e 2005). Como demonstrado por estudos imunocitoquímicos a expressão de proteínas de MT1 e MT2 em pele humana era de tipo célula - célula e dependente de compartimento (Slominski et al. 2005), o que sugere a selectividade de ação da melatonina. A radiação ultravioleta a 100 mJ/cm<sup>2</sup> induz a expressão do gene

MT1 nos melanócitos epidérmicos neonatais, e promove uma inibição em células de melanoma. Expressão do gene MT2 também foi regulada ou modificada por UVB em queratinócitos epidérmicos, melanócitos epidérmicos e fibroblastos dérmicos (Slominski et al. 2003a).

A melatonina é gerada e metabolizada na pele para afetar o seu fenótipo, bem como para servir como um agente de proteção contra a radiação UV. Alguns dos efeitos de melatonina são mediados através da sua interação com os receptores da melatonina. Outras ações resultam de efeitos diretos, independente de receptores dessa molécula varredora de radicais livres. As atividades pleiotrópicas do sistema melatoninérgico cutâneo são mediadas por autócrinos ou parácrinos o que permite uma neutralização ou atenuação de ambos os fatores de estresse ambientais ou endógenos para a manutenção da integridade da pele (Figura 11) (Slominski et al. 2012).

Ações não-receptores são mediadas através de uma interação com proteínas intracelulares, tais como NQO2 ou calmodulina. Melatonina e seus metabólitos podem atuar como varredores diretos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) e proteger funções mitocondriais. Os efeitos diretos são mostrados por linhas contínuas e os efeitos indiretos são mostrados por linhas tracejadas setas (Slominski et al. 2008).



**Figura 11:** Cascata que mostra o efeito da melatonina sintetizada intra ou extracelular e que pode regular o fenótipo da pele por meio da interação com receptores de melatonina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em duas etapas. A primeira correspondeu à avaliação de dois produtos Fórmula 1 e Ativo 1 em testes *in vitro*. Todos os testes foram realizados em triplicatas. A segunda etapa correspondeu ao teste de cinco formulações, com estes princípios ativos, em voluntários humanos (mínimo de 30 repetições por creme).

### 4.1. FASE 1 – Teste *in vitro* da atividade da Fórmula 1 e Ativo 1

Foram produzidos e estabilizados dois produtos: um denominado de ativo e outro de creme. Os mesmos foram denominados Ativo 1 e Fórmula 1, respectivamente.

A Fórmula 1 era composta por creme preparado com 10% de extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* concentrado a 50% e melatonina a 0,01%. O Ativo 1 era composto por 10% de extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* concentrado a 50%. Foram analisados os efeitos do Ativo 1 e da Fórmula 1. Esses foram testados em cultivo celular de fibroblastos humanos e em melanócitos murinos. Submeteu-se tanto o ativo, quanto a fórmula às análises imunohistoquímicas e anatomopatológicas. Os seguintes dados foram analisados: potencial citotóxico; determinação da atividade antioxidante; determinação do efeito sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD); atividade tirosinase; teor de melanina.

#### 4.1.1 Cultura de Fibroblastos Humanos para Teste do Potencial Citotóxico

Fibroblastos humanos (Clonetics, Cambrex/Lonza, USA) e células B16F10 (CRL-6475) foram semeados em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, cultivados e expandidos em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Ao atingirem confluência na 5ª passagem, as células foram semeadas em placas de seis poços para posterior incubação com os produtos-teste, irradiação e avaliação dos parâmetros propostos.

#### 4.1.2 Incubação com o Produto-Teste

Fibroblastos humanos foram incubados por um período de 48 horas com quatro concentrações não citotóxicas (12,5; 6,25; 3,125 % (v/v)) do princípio ATIVO 1, determinadas previamente por meio da técnica de MTT(3-(4,5 *dimethyl thiazole-2yl*)-2,5 *diphenyl tetrazolium bromide*) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.). As culturas celulares permaneceram em contato com os produtos-teste por 48 horas, para então coletar o lisado celular ou RNA.

#### 4.1.3 Cultura de Melanócitos Murinos B16F10

Melanócitos murinos (B16F10) foram semeados em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, cultivados e expandidos em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB. Ao atingirem confluência, as células foram semeadas em placas de 06 poços para posterior incubação de 48 horas com o produto-teste. As culturas de melanócitos foram incubadas, com cinco concentrações, não-citotóxicas do produto SISTEMA PROTEÇÃO AVANÇADA EFEITO BRONZEADOR FPS 45 (12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 %(v/v)).

Um simulador de radiação ultravioleta (UV) (SOL-500; Honle) foi utilizado para a irradiação de um conjunto de grupos celulares, já mantidas em contato com o produto-teste por 24 horas. As radiações UVB e UVC foram reduzidas com um filtro apropriado. O instrumento foi estabilizado por, no mínimo, 15 minutos antes da irradiação das culturas celulares. A intensidade emitida pelo simulador foi calibrada antes do uso para emissão de 3 J/cm<sup>2</sup> de UVA. Após a foto estimulação, as células permaneceram em contato com o SISTEMA PROTEÇÃO AVANÇADA EFEITO BRONZEADOR FPS 45 por 24 horas.

#### 4.1.4 Determinação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi mensurada no lisado celular das culturas utilizando um kit de ensaio disponível comercialmente (Cayman Chemical Co., Ann Arbor-MI).

A detecção de SOD é feita com a utilização de sal de tetrazolium (MTT) para detectar radicais superóxidos que são gerados pela adição de xantina oxidase às amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para promover 50% de diminuição dos radicais superóxidos.

A atividade da SOD foi calculada com base na concentração conhecida dos padrões de SOD (U/mL).

#### 4.1.5 Determinação da Atividade da Enzima Tirosinase

A atividade da enzima tirosinase foi determinada espectrofotometricamente. Tirosinase extraída de cogumelo (SIGMA®) foi diluída em tampão fosfato 50 mM e, em seguida, foram adicionados 20 µL do ativo em diferentes concentrações à solução. A seguir, a mistura foi incubada a 37°C por 90 minutos, sob agitação. Após o período de incubação, a solução de L-DOPA (SIGMA) 2,5 mM foi adicionada à mistura, que então foi mantida em temperatura ambiente por 15 minutos. A formação de dopaquinona foi determinada através da mensuração de absorbância em 450 nm.

#### 4.1.6 Determinação do Teor de Melanina

O teor de melanina foi determinado colorimetricamente, utilizando um padrão de melanina (Melanin Synthetic, Sigma-Aldrich, Cat. n. M0418).

Os melanócitos foram tripsinizados e centrifugados a 12.000g por 10 minutos. Em seguida, foram solubilizados em 120 µL de solução de NaOH 1N por 1 hora a 80°C. Similarmente, tubos foram preparados para elaboração da curva-padrão utilizando o padrão de melanina sintética (0,012 a 400 µg/mL). A absorbância foi mensurada a 405 nm e a quantificação do teor de melanina foi

realizada com base na curva-padrão gerada para a melanina sintética. O teor de melanina foi expresso em  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.1.7 Incubação de Fragmentos de Pele *ex vivo*

Após o procedimento cirúrgico realizado pelo corpo clínico de cirurgias plásticas oftálmicas, fragmentos de pálpebras foram colocados em frascos contendo solução salina 0,9% até o momento do experimento.

Amostras biológicas foram retiradas da solução salina, imersas em etanol 70% por 15 segundos e lavadas duas vezes em nova solução salina.

Os fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura para um máximo de 48 horas para o tratamento com o produto FORMULA 1 (10% de extrato de esporos de *G. lucidum* concentrado a 50% e melatonina a 0,01).

O produto foi aplicado sobre a pele a uma razão de  $2 \text{ mg/cm}^2$ .

#### 4.1.8 Simulação de Estresse Solar (irradiação UVA/UVB)

Um simulador de radiação ultravioleta (UVA e UVB) (SOL-500, Honle) foi utilizado para a irradiação dos fragmentos de pele *ex vivo*. A radiação UVC foi reduzida com filtro apropriado. O instrumento foi estabilizado por, no mínimo, 15 minutos antes da irradiação e a intensidade emitida pelo simulador foi calibrada antes do uso para emissão de  $3 \text{ J/cm}^2$ . Após 24 horas de tratamento os fragmentos de pele foram submetidos à irradiação e, em seguida, mantidos por mais 24 horas em contato com o produto-teste.

#### 4.1.9. Determinação da Atividade Antioxidante

A concentração de antioxidantes totais foi medida em lisados dos tecidos usando um kit de teste disponível comercialmente (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MI).



O princípio do ensaio antioxidante é a formação de um radical de mioglobina ferril a partir de metamioglobina e peróxido de hidrogênio, que oxida o ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-ácido sulfônico) para produzir um radical cátion, ABTS<sup>+</sup>, um cromógeno solúvel que apresenta coloração verde, o qual pode ser determinado espectrofotometricamente a 405 nm. A concentração de antioxidantes é calculada com base no padrão Trolox e representada em unidades de densidade óptica (DO).

#### 4.1.10 Determinação de Citotoxicidade

##### Cultura de fibroblastos humanos

Fibroblastos humanos criopreservados (Clonetics, Cambrex/Lonza, USA) foram semeados em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc, New York, NY), cultivados e expandidos até pelo menos a quinta passagem, em estufa úmida a 37°C em presença de 5 % de CO<sub>2</sub>, utilizando meio de cultura específico.

Ao atingirem aproximadamente 80-90 % de confluência, as células foram tripsinizadas (Trypsin-EDTA 4/solution), neutralizadas, centrifugadas (220 x g) por 10 minutos, contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços (Nunc, USA) para posterior incubação com o produto-teste e avaliação do potencial citotóxico.

#### 4.1.11. Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

A viabilidade celular foi determinada por um método colorimétrico que utiliza o corante MTT (3-(4,5dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), que se converte de brometo de tetrazolium amarelo (MTT) para formazan azul pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis.

Fibroblastos foram semeados na densidade de 1x10<sup>4</sup> células/poço em placas de 96 poços (Nunc, Roskilde, DM). O produto-teste ATIVO 1 foi dissolvido no meio de cultura e adicionado à placa em uma diluição seriada na faixa de

0,0008 a 50 % (m/v). A cultura foi incubada por um período de 48 horas e o MTT foi então adicionado à cultura na concentração de 5 mg/mL (50 µL/poço) a qual foi incubada por mais 4 horas. A absorbância de cada poço foi determinada a 570 nm em um leitor de microplacas. A taxa de morte celular foi expressa em porcentagem, conforme fórmula abaixo:

$$\text{células mortas} = 100 - \left( \frac{\text{absorbância da amostra (poço tratado)}}{\text{absorbância do controle}} \times 100 \right)$$

Escala para classificação do potencial citotóxico foi estabelecida intralaboratorialmente em uma escala para ativos e produtos cosméticos conforme tabela 1.

**Tabela 1:** Escala para classificação do potencial citotóxico estabelecida intralaboratorialmente para ativos e produtos cosméticos:

% de Células Mortas	Classificação
>50%	Citotoxicidade importante
>25% à ≤50%	Citotoxicidade moderada
<25%	Citotoxicidade negligível ou pouco importante

#### 4.1.12 Determinação da Atividade Antioxidante

A concentração de antioxidantes totais foi medida em lisados dos tecidos usando um kit de teste disponível comercialmente (Sigma-Aldrich Inc., Saint Louis, MI).

O princípio do ensaio antioxidante é a formação de um radical de mioglobina ferril a partir demetamioglobina e peróxido de hidrogênio, que oxida o ABTS (2,2-azino-bis (3 ethylbenzthiazoline-6-ácido sulfônico) para produzir um radical cátion, ABTS +, um cromógeno solúvel que apresenta coloração verde e

pode ser determinado espectrofotometricamente a 405 nm. A concentração de antioxidantes é calculada com base no padrão Trolox e representada em unidades de densidade óptica (DO).

#### 4.1.13. Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA). O teste de Dunett foi utilizado quando a análise de variância detectava diferenças significativas entre os grupos. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de p foram inferiores a 0,05.

#### 4.2. FASE 2: ENSAIO CLINICO

Realizou-se um ensaio clínico duplo cego randomizado. Foram preparadas cinco formulações dermatológicas denominadas A, E, I, O e U, para a fase 2 do experimento.

Tal fase durou 90 dias. Foram incluídos 132 voluntários divididos nos grupos. Os pacientes foram analisados no momento 0, 30 dias, 60 dias e 90 dias após o uso. Os grupos foram nominados de A, E, I, O e U. As composições dos cremes estão apresentadas no quadro 2.

Para esses grupos (biocremes) foram analisados os seguintes parâmetros:

- *Poros*: compreendendo o percentual de poros pequenos e de poros largos.
- *Manchas*: foram avaliados o percentual de manchas; o número total de manchas visíveis a olho nu; número total de manchas ultravioletas.
- *Rugas*: para este parâmetro foram avaliados volume das rugas; área das rugas; profundidade das rugas e o percentual de redução de rugas.

**Quadro 2:** Formulações das preparações dos biocremes denominados A a U.

Grupo	Composição
A	20% v/v extrato aquoso de biomassa de <i>Spirulina</i> melatonina a 0,02% Creme Base
E	10% v/v extrato aquoso de Esporos de <i>Ganoderma</i> + 10% extrato de <i>Spirulina</i> 0,02% melatonina Creme Base
I	Melatonina 0,02% Creme Base
O	10% v/v extrato aquoso de esporos de <i>Ganoderma</i> melatonina a 0,01% Creme Base
U	Creme Base

Foi utilizado creme base da marca EMFALO, contendo os seguintes componentes: água deionizada, glicerina, propilenoglicol, sulfato de sódio, octilestearato, lanolina, DC 350, ciclometicona, BHT, óleo mineral, EDTA dissódico, metilparabenzeno, propilparabenzeno, imidazolidinil ureia. As concentrações de cada componente no creme base não foram informadas pela empresa, pois se trata de segredo industrial.

Os parâmetros (poros, manchas e rugas) foram avaliados no dia 0, que se tratava de pele sem uso de biocreme algum. E os mesmos foram avaliados 30 dias após utilização dos biocremes e 60 dias após início de uso do tratamento.

Tais análises foram efetuadas por meio de um aparelho e software - Quick Vision - Visioface que permite uma análise objetiva e detalhada da saúde da pele.

O Visioface trata-se de um sistema de obtenção de fotos de rosto em alta definição, composto de câmara fotográfica digital com iluminação por luz branca de diodo. O software VisioFace Quick permite a avaliação de parâmetros de interesse como: manchas, poros, rugas e desnivelamento da superfície de pele. O software gera imagem do tipo ultravioleta para análise de manchas de envelhecimento. Além dessas análises os voluntários responderam um questionário de avaliação, que incluía os seguintes itens:

Sexo  
Idade  
Peso  
Altura  
Índice de massa corpórea  
Tabagismo  
Prática de atividade física  
Uso de anticoncepcional oral

Alergias  
Uso de fotoproteção  
Ritmo alimentar  
Patologias e Psicoses

Ainda os indivíduos foram classificados quanto ao tipo de pele, flacidez e fotodermatoses, segundo metodologias descritas por: Fitzpatrick, Glocou e Mark Rubin.

Aplicou-se também um questionário para análise subjetiva quanto ao grau de hidratação da pele, avaliação de melhora ou não de flacidez, análise das rugas finas, manchas e presença de efeito colateral como alergias ou outros.

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

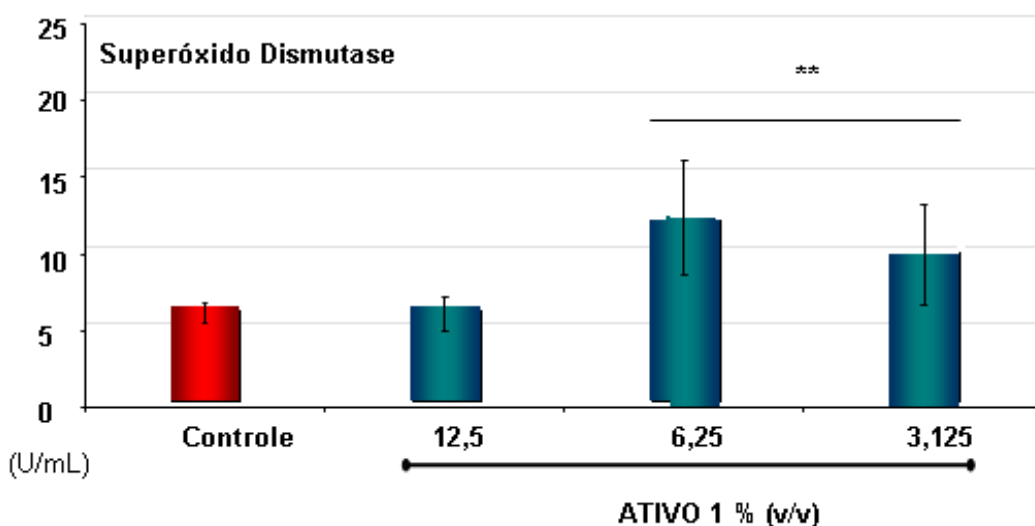
Os valores dos resultados da análise objetiva dos biocremes foram submetidos a testes de normalidade. Quando o teste de normalidade foi significativo, utilizou-se o teste estatístico Análise da Variância (ANOVA), comparando as médias dos valores. Quando os valores não se distribuíram segundo uma curva normal, foi utilizado o teste não paramétrico KruskalWalis. O software utilizado foi o Assistat versão 7.7.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SOD

O produto **ATIVO 1** foi capaz de elevar significativamente ( $p < 0,01$ ) a atividade da enzima superóxido dismutase em cultura de fibroblastos humanos, nas duas menores concentrações avaliadas. De acordo com a Figura 12, observa-se que nas concentrações de 6,25 e 3,125% (v/v), o produto-teste foi capaz de elevar a atividade de SOD em 100% e 61%, respectivamente. Dessa forma, fica evidente que o extrato aquoso de esporos de *G. lucidum* possui componentes bioativos capazes de estimular a produção da enzima SOD de forma expressiva.

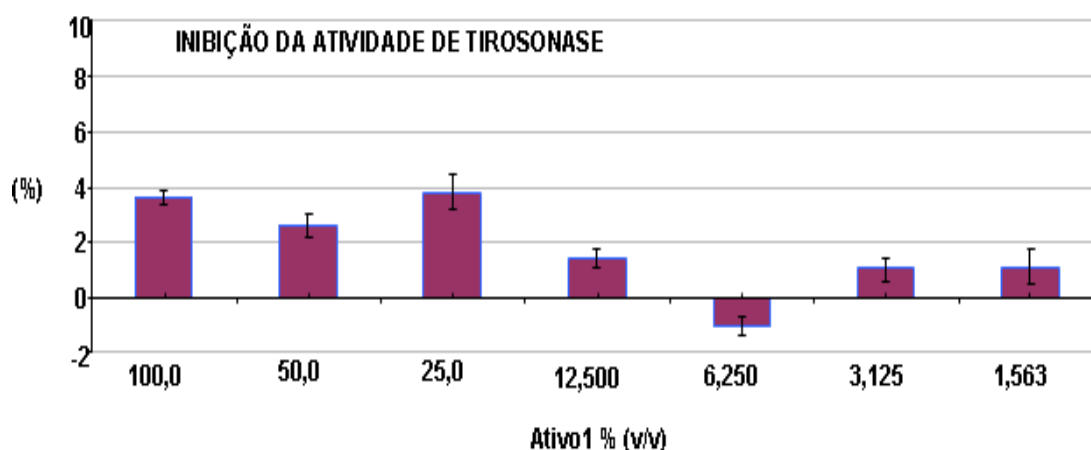
As condições experimentais adotadas, através da utilização de células humanas em condições ótimas de cultivo, condizem com as metodologias atuais aplicadas, aceitas e validadas pela comunidade científica internacional. As culturas celulares humanas foram adquiridas comercialmente de companhias internacionais qualificadas e certificadas.



**Figura 12:** Efeitos das diferentes concentrações do produto denominado ATIVO 1 sobre a atividade da enzima Superóxido Dismutase em cultura de fibroblastos humanos. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $P < 0,05$ , em relação ao Controle; \*\* $P < 0,01$ , em relação ao Controle (ANOVA, Dunnet).

## 5.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE

O produto denominado **ATIVO 1** apresentou discreta capacidade inibidora da atividade da enzima tirosinase (Figura 13). Observa-se que na concentração de 100 % (v/v), o produto-teste é capaz de inibir a atividade da enzima em 3,64%. Em todos os grupos estudados, foram considerados estatisticamente significativos aqueles cujos valores de P foram inferiores a 0,05.

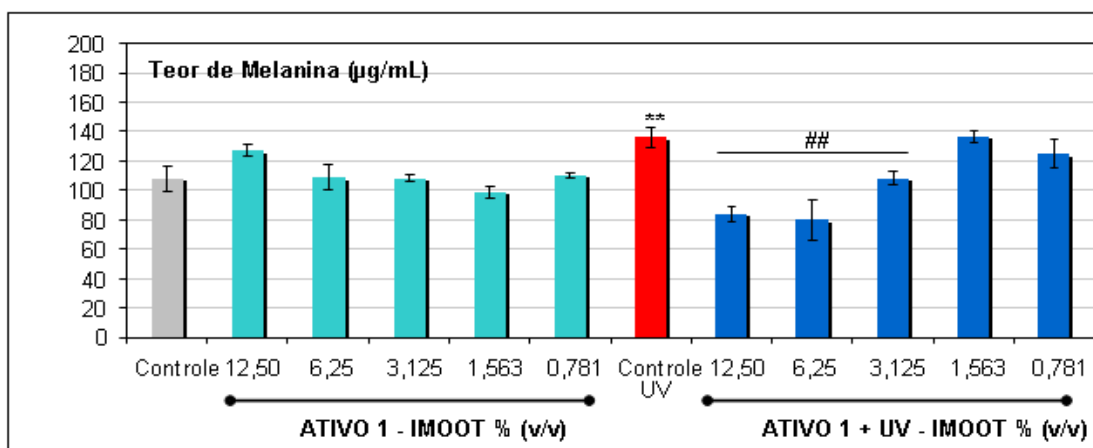


**Figura 13:** Efeito do ATIVO 1 sobre a atividade da enzima tirosinase.

## 5.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MELANINA

O produto **ATIVO 1** não exerceu efeitos significativos sobre a síntese de melanina em melanócitos em condição basal (Figura 14). Em contrapartida, mediante exposição à radiação, melanócitos tratados com o produto-teste apresentaram níveis de melanina significativamente inferiores ao grupo controle irradiado. Na faixa de concentração de 12,5; 6,25 e 3,12 % (v/v), o produto-teste foi capaz de reduzir a síntese do pigmento em 39%, 42% e 21%, respectivamente. Para avaliação da capacidade despigmentante, foi avaliado o efeito do produto-teste sobre a produção de melanina em cultura de células.

Os dados apresentados evidenciam a capacidade despigmentante do produto, em substrato biológico mediante exposição à irradiação.



**Figura 14:** Teor de melanina em culturas de melanócitos murinos incubados com ATIVO 1. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão. \* $P < 0,05$ , em relação ao controle basal; \*\* $P < 0,01$ , em relação ao controle basal; ## $P < 0,01$ , em relação ao controle irradiado (UV) (ANOVA, Dunnet).

#### 5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

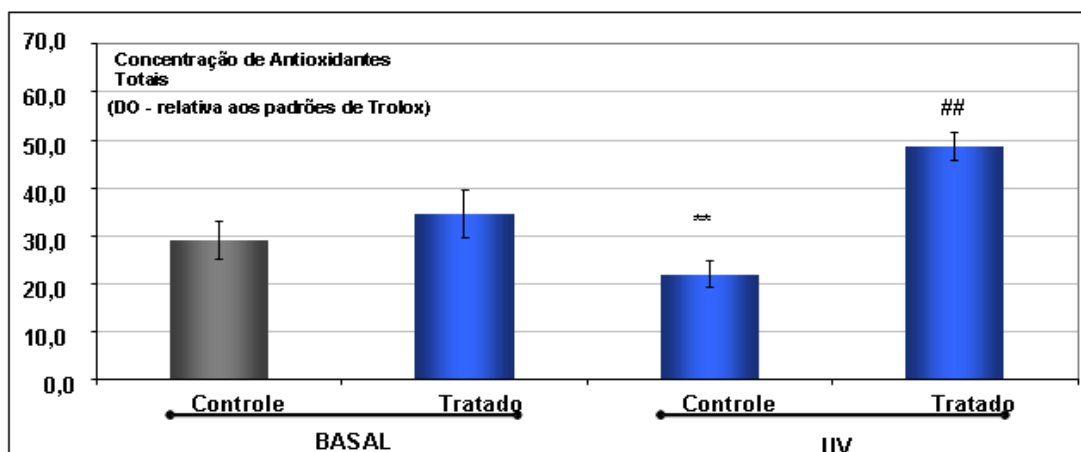
O produto denominado **Fórmula 1**, quando aplicado em fragmentos de pele nas concentrações sob condição basal, não promoveu aumento significativo sobre a concentração de antioxidantes em lisados teciduais quando comparado ao grupo controle (Figura 15).

Em contrapartida, observou-se que com a exposição de fragmentos de pele à irradiação, os níveis de antioxidantes são reduzidos significativamente.

Além disso, fragmentos de pele submetidos à irradiação tratados com o produto **Fórmula 1** tiveram os níveis de antioxidantes, relativos aos padrões de Trolox, aumentados 100% em comparação ao grupo controle irradiado. Estes resultados demonstram a capacidade antioxidante do produto de teste.

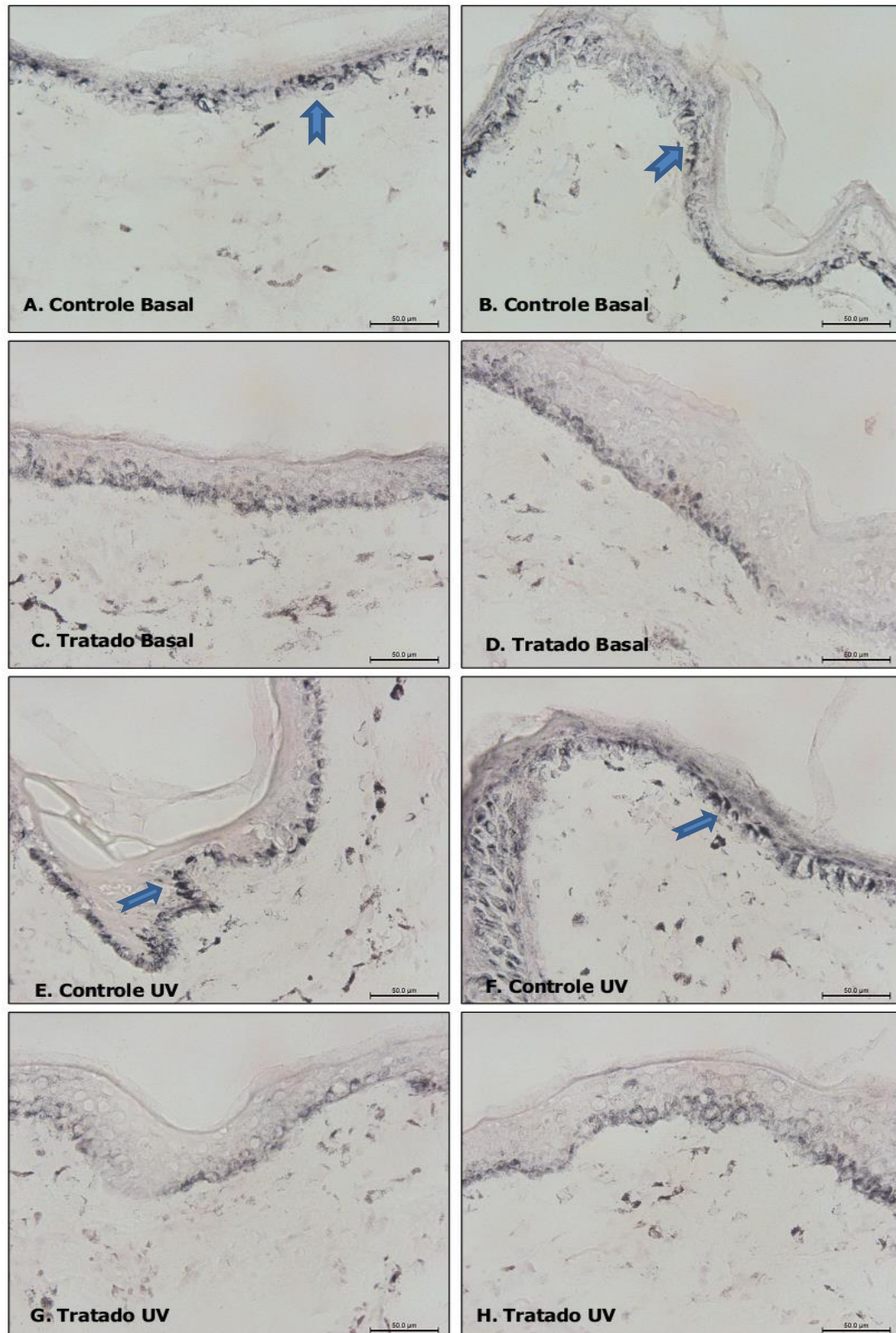
Observou-se que a irradiação sobre os fragmentos de pele (Figura 16 E e F) foi capaz de elevar os níveis de melanina em comparação ao grupo controle basal (Figura 16 A e B). Além disso, os fragmentos de pele incubados com o produto sob condição basal (Figura 16 C e D) apresentaram redução dos níveis de melanina em comparação ao grupo controle basal. Nos fragmentos de pele submetidos à irradiação e tratados com **a Fórmula 1**, observou-se redução dos níveis de melanina em relação ao grupo controle irradiado.



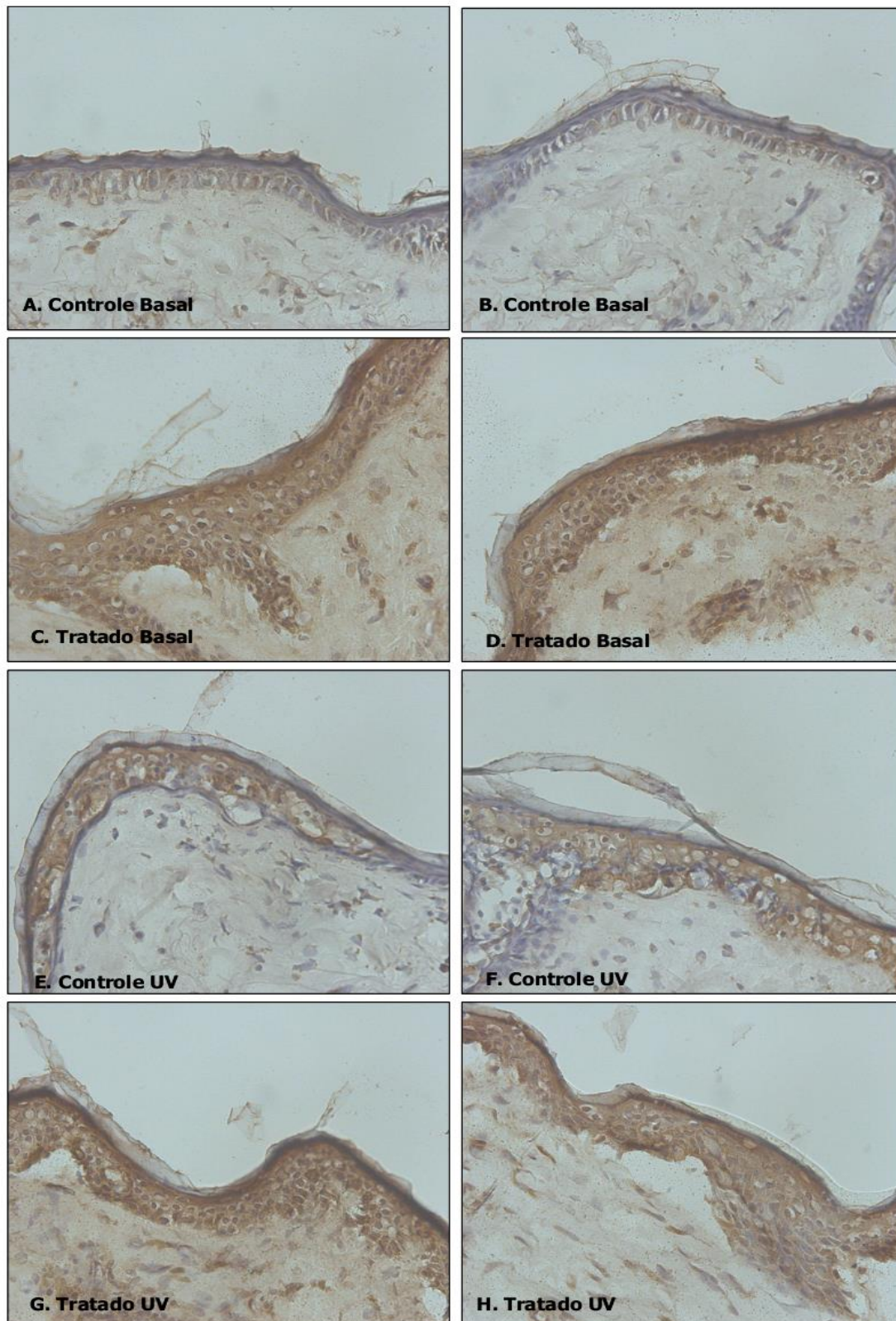


**Figura 15:** Efeitos da FORMULAÇÃO 1 na produção de radicais livres em fragmentos de pele *ex vivo*. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \*\* $P < 0,01$ , comparado ao grupo controle basal; ## $P < 0,01$ , comparado ao grupo controle irradiado (ANOVA, Dunnet).

Os resultados mostram que a irradiação sobre os fragmentos de pele (Figura 17 E e F) foi capaz de elevar o sinal de marcação anti-PAR-2 (precipitado marrom) em comparação ao grupo controle basal (Figura 17 A e B). Além disso, os fragmentos de pele incubados com o produto **F1** sob condição basal (Figura 17 C e D) apresentaram aumento dos sinais anti-PAR-2 em comparação ao grupo controle basal. Nos fragmentos de pele submetidos à irradiação e tratados com **F1**, observou-se aumento da produção de PAR-2 em relação ao grupo controle irradiado. Esses resultados contrastam aos referentes à avaliação de melanina, o que sugere que o efeito despigmentante obtido ocorra através de outro mecanismo de ação.



**Figura 16:** Avaliação por método Fontana Masson. Cortes histológicos de 07 µm em fragmentos de pele humana ex-vivo foram incubados com meio de cultura (A e B; 400x), tratados em condição basal (C e D; 400x) ou incubados em meio de cultura e irradiados (E e F; 400x); e fragmentos de pele irradiados e incubados com o produto **FORMULAÇÃO 1** (imagens G e H; 400x).

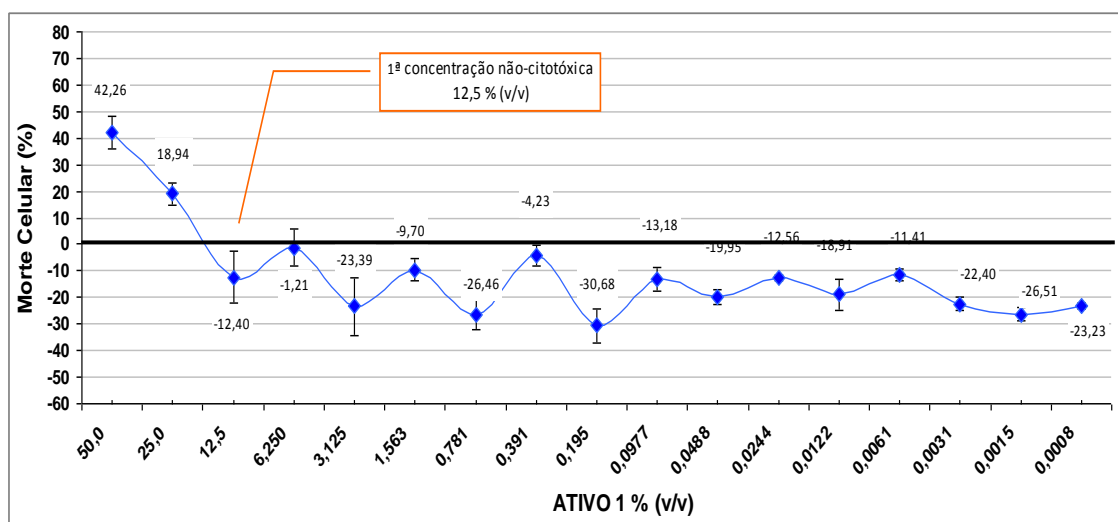


**Figura 17:** Avaliação de PAR-2 por imunohistoquímica. Cortes histológicos de 07  $\mu\text{m}$  em fragmentos de pele humana ex-vivo incubados com meio de cultura (A e B; 400x), tratados em condição basal (C e D; 400x) ou incubados em meio de cultura e irradiados (E e F; 400x); e fragmentos de pele irradiados e incubados com o produto FORMULAÇÃO 1 (imagens G e H; 400x).



### 5.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO (VIABILIDADE CELULAR)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 18, e seguindo a classificação da Tabela 1, (ver material e métodos) o produto ATIVO 1 apresentou citotoxicidade moderada na concentração de 50% (v/v), a qual foi responsável por uma redução de até 42% da viabilidade celular. A partir da concentração de 25% (v/v) até a concentração de 0,0008% (v/v) o produto apresenta citotoxicidade pouco importante ou negligível, mantendo a viabilidade celular próxima ou superior a 100% quando comparada ao controle.



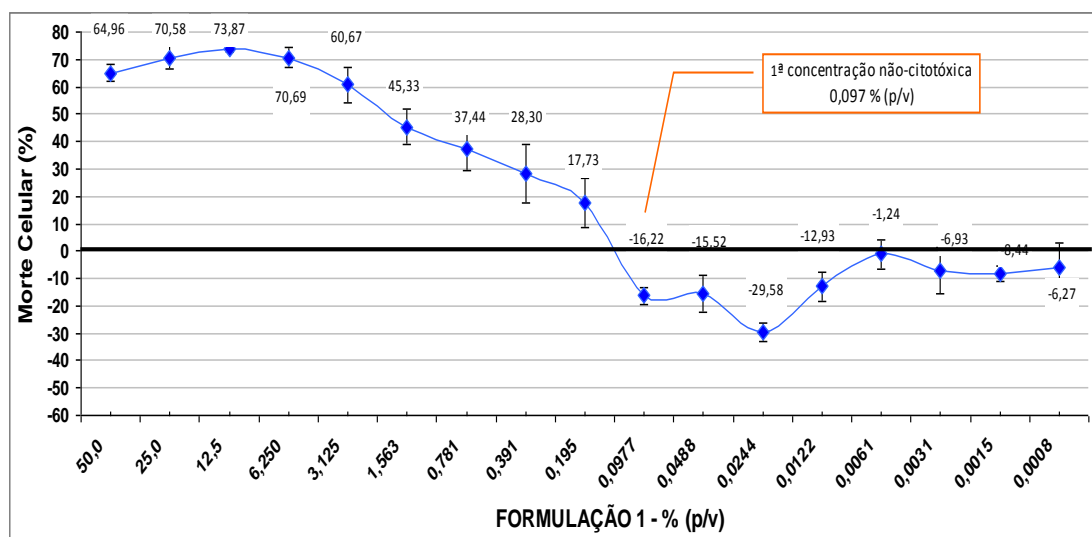
**Figura 18:** Efeitos do produto ATIVO 1 sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos após 48 horas de incubação. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.

### 5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO (VIABILIDADE CELULAR)

De acordo com os resultados apresentados (Figura 19), e seguindo a classificação da Tabela 1 (em Material e Métodos), o produto **FORMULAÇÃO 1** apresentou citotoxicidade importante na faixa de concentração de 50 a 3,125% (p/v), as quais foram responsáveis por uma redução de até 73% da viabilidade celular.

Na faixa de concentração de 1,56 a 0,391% (p/v) o produto-teste apresentou citotoxicidade moderada mantendo a viabilidade celular em até 72%.

A partir da concentração de 0,195% (p/v) até a concentração de 0,0008% (p/v) o produto apresenta citotoxicidade pouco importante ou negligível, mantendo a viabilidade celular próxima ou superior a 100% quando comparada ao controle (Figura 19).



**Figura 19:** Efeitos do produto FORMULAÇÃO 1 sobre a viabilidade celular de fibroblastos humanos após 48 horas de incubação. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão.

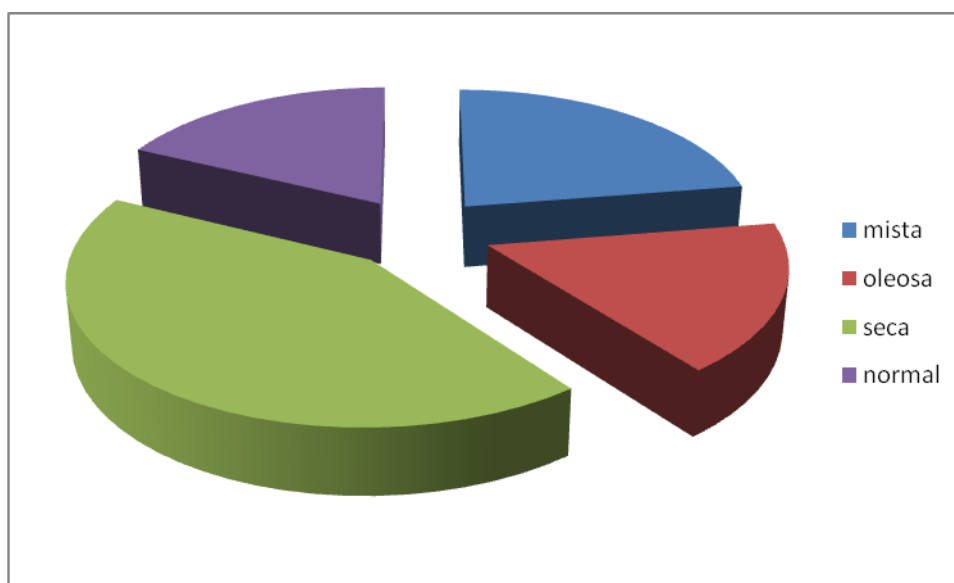
## 5.7. ANÁLISE QUALITATIVA DOS CREMES ESTUDADOS

Iniciou-se o estudo com 150 pacientes, divididos em um número de 30 pessoas por grupo. Destes 129 pacientes terminaram o estudo. Tal redução foi ocasionada por motivos outros que aos determinantes pelo estudo. A idade média dos pacientes analisados foi de 41,15 anos. Desses apenas 6,2% eram do sexo masculino. Dos pacientes 37,20% não utilizavam regularmente fotoprotetor solar. Dos pacientes analisados 13,95% eram tabagistas, 44,18% eram praticantes de atividade física regularmente.

Ao avaliar a pele das pacientes no dia 0 (início do experimento) verificou-se que 61,24% das mesmas apresentavam hiperpigmentações na pele, e 9,30% eram portadoras de melasma.

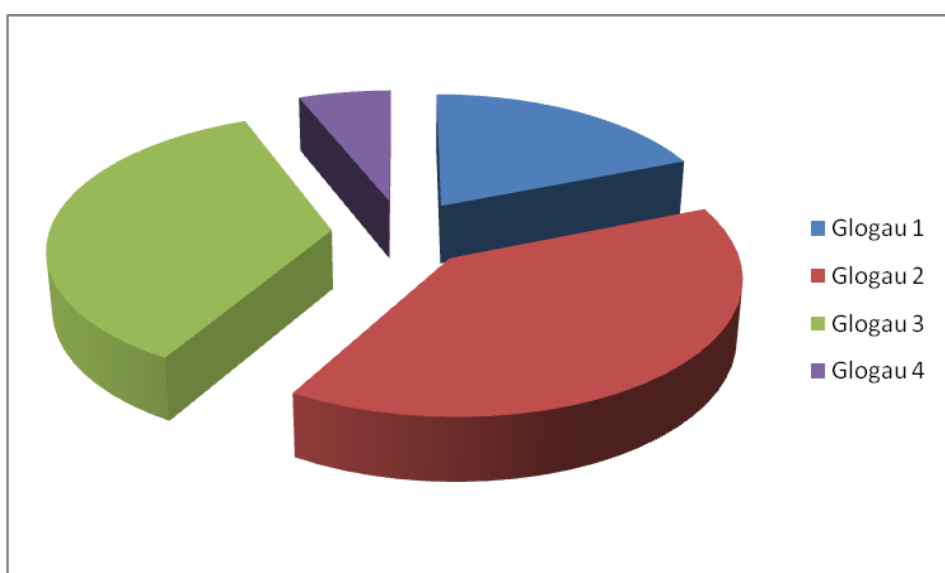
Quanto à classificação da pele, segundo o biótipo verificou-se que 22,48% dos pacientes possuíam pele tipo mista, 17,05% apresentavam pele oleosa,

42,63% apresentavam pele seca e 17,82% apresentavam pele normal (Figura 20).



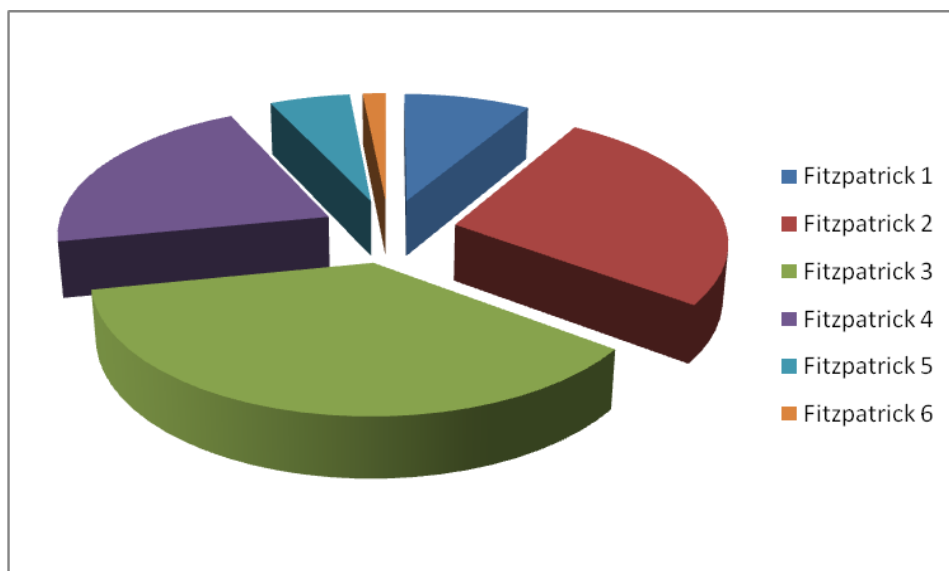
**Figura 20:** Classificação segundo biótipo da pele dos participantes do experimento.

Quanto à classificação Glogau, 19,37% era glogau1; 40,31% era glogau 2, 36,43% era glogau 3; e 6,20% era glogau 4 (Figura 21).



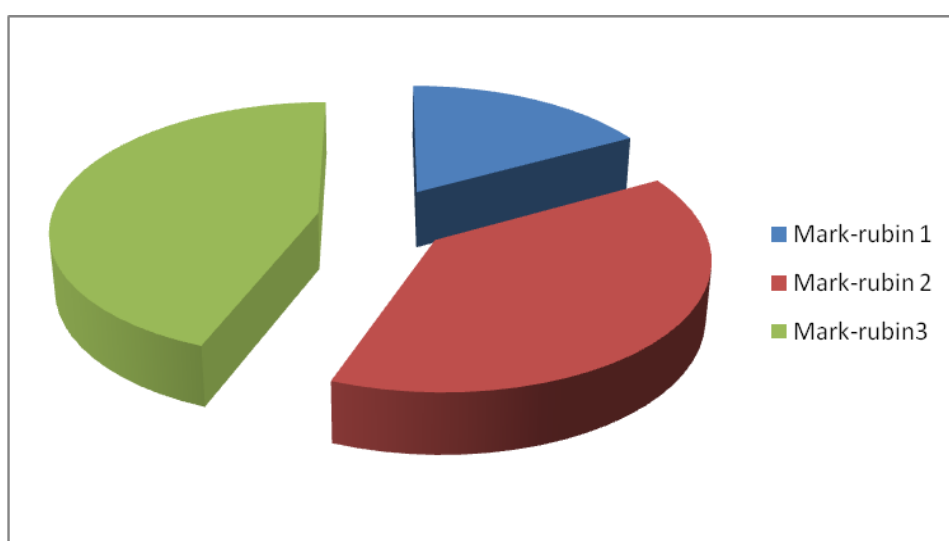
**Figura 21:** Percentual dos pacientes avaliados e divididos segundo à classificação de Glogau.

Segundo a classificação de Fitzpatrick observou-se que 8,52% dos pacientes eram do fototipo 1; 26,35% do fototipo 2; 36,43% do fototipo 3; 20,93% do fototipo 4; 42% do fototipo 5 e 1,55% do fototipo 6 (Figura 22).



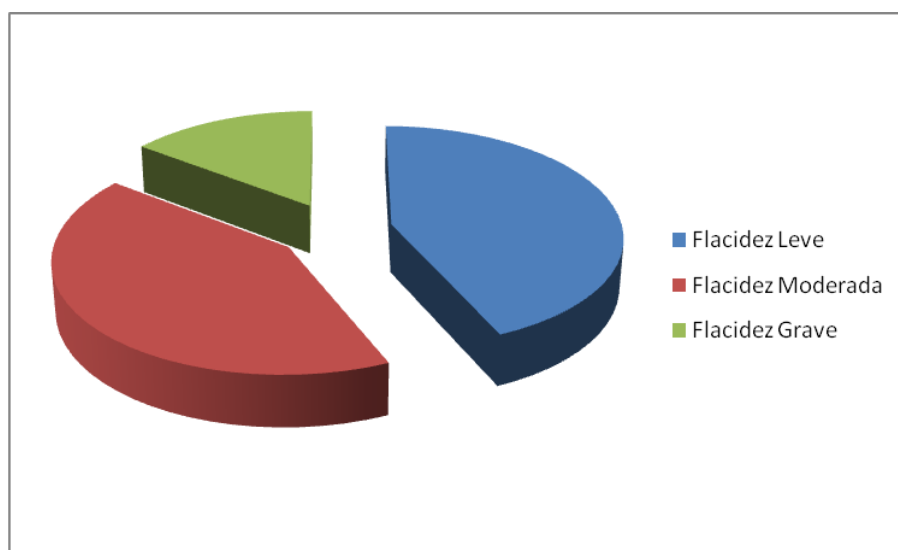
**Figura 22:** Pacientes avaliados divididos segundo classificação de Fitzpatrick.

Quanto à classificação de Mark-rubin 17,05% pertenciam a classe1, 38,75% eram classe 2, e 44,18% foram classificados na classe 3 (Figura 23).



**Figura 23:** Pacientes avaliados divididos segundo classificação de Mark-Rubin.

Quanto à flacidez da pele: 43,41% foram classificados como leve, 41,86% como moderada, e 14,72% como grave (Figura 24).



**Figura 24:** Pacientes distribuídos segundo a classificação do grau de flacidez da pele.

## 5.8 ANÁLISE QUALITATIVA

A primeira etapa do estudo baseou-se em uma análise qualitativa da pele. Onde os pacientes avaliados tinham que dar uma nota de 0 a 10 quanto a alguns parâmetros. Esses parâmetros foram avaliados 30, 60 e 90 dias após o início do uso do creme.

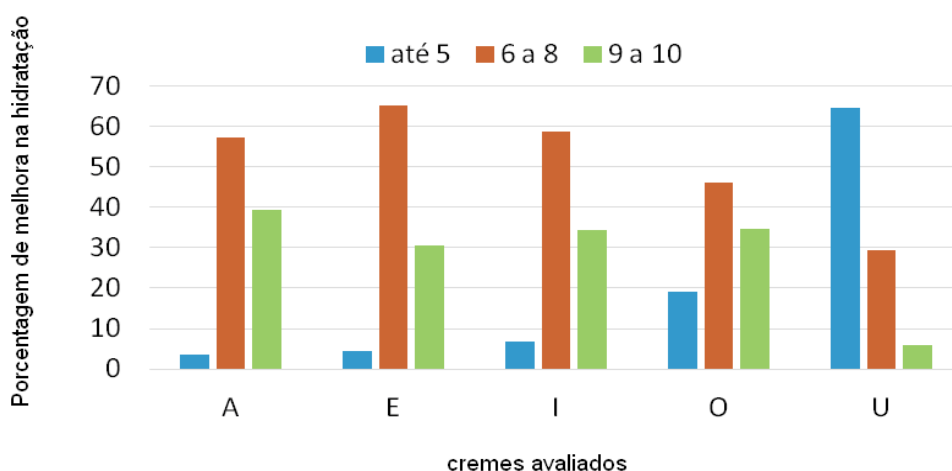
Os parâmetros avaliados foram: melhora da hidratação, melhora da flacidez, melhora das manchas e melhora das rugas. Sendo que os pacientes foram divididos em 5 grupos de acordo com a formulação do creme utilizado.

Nas figuras de 25 a 37 são demonstrados os desempenhos destas formulações nos respectivos tempos.

Nesta etapa (30 dias) foram avaliadas quatro formulações A a O e controle negativo (U). No controle negativo foi usado apenas a base de formulação do creme. As quatro formulações tiveram escore entre 6 e 8, indo de 45 a 65% (Figura 25). O grupo A apresentou melhor escore de notas, pois 39,29% relataram melhora de 9-10 na hidratação de sua pele após 30 dias de uso. O

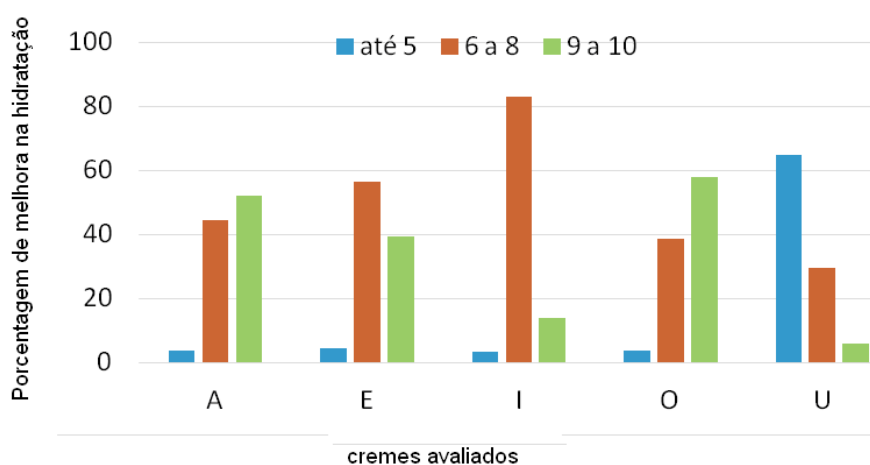


grupo O foi o segundo melhor avaliado com 34,62% de notas entre 9 e 10 nesse mesmo intervalo de uso.



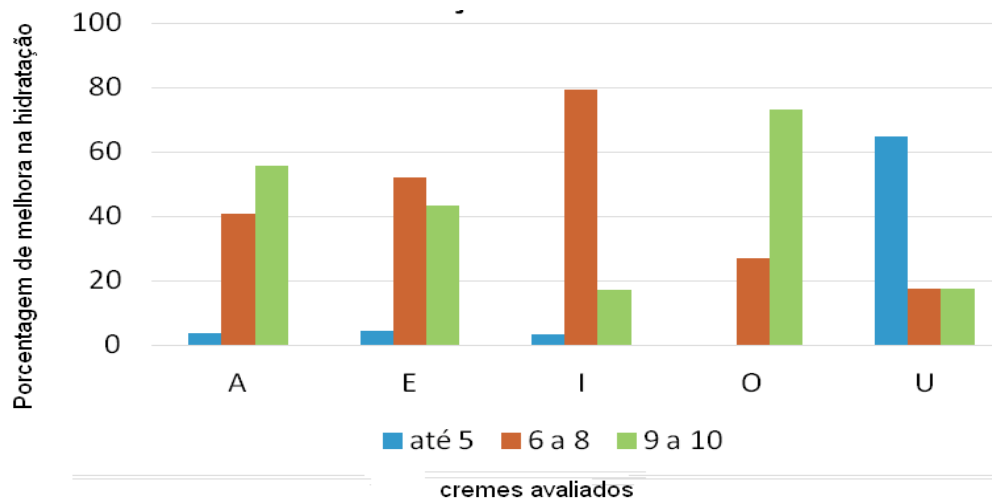
**Figura 25:** Percentual de melhora para o parâmetro hidratação para a pele facial com 30 dias de avaliação.

Na avaliação com 60 dias verificou-se que a formulação que teve maior escore entre 6 a 8 foi a formulação I. Enquanto que escore 9 a 10 foram atribuídos às formulações A e O (Figura 26). A melhor classificação ficou com o grupo O onde 57,69% dos pacientes classificaram em 9-10 a melhora da hidratação da pele. O grupo A apresentou resultado semelhante em 51,85% de escores 9-10. O grupo controle por sua vez teve nota 5 ou menor em 64,71% dos pacientes avaliados.



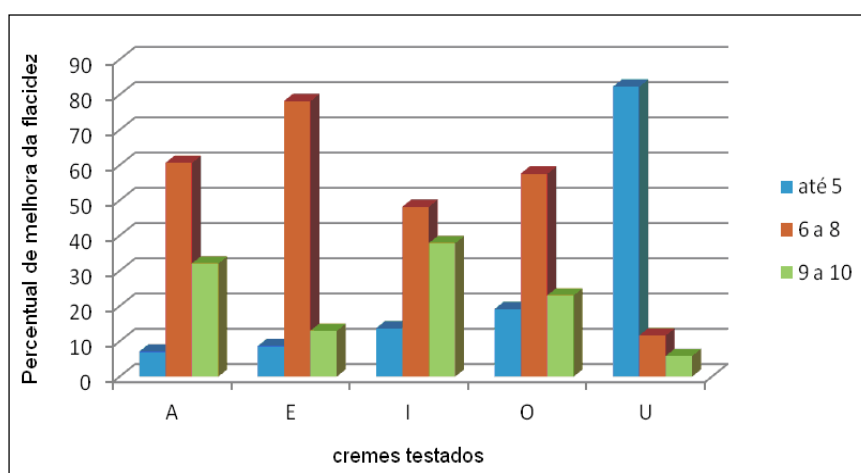
**Figura 26:** Percentual de melhora para o parâmetro hidratação para a pele facial com 60 dias de avaliação.

Com 90 dias a formulação A teve pontuação entre 9 e 10 em 55% dos casos e a formulação O teve 70% dos escores entre 9 e 10. A formulação I teve escore 8 (Figura 27).



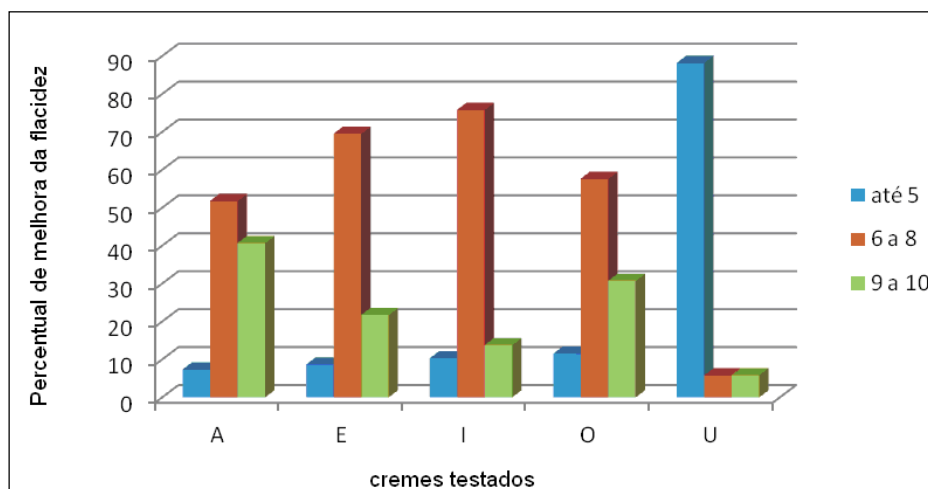
**Figura 27:** Percentual de melhora para o parâmetro hidratação para a pele facial com 90 dias de avaliação.

O segundo parâmetro avaliado foi a flacidez da pele. Nesse parâmetro observou-se, para 30 dias após o início de uso, no grupo E onde 78,26% deram nota de 6-8 e 32,14% do grupo A deu notas de 9-10 para melhora da flacidez (Figura 28).



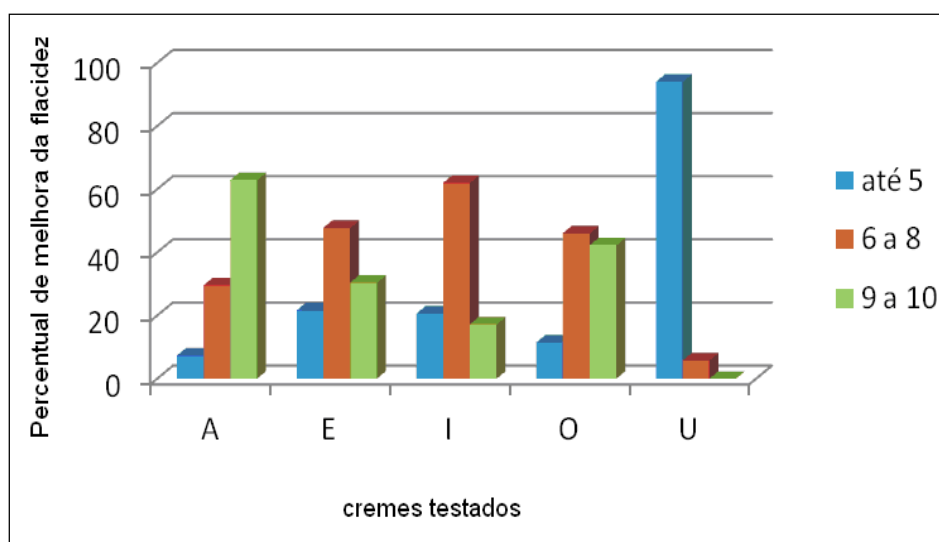
**Figura 28:** Percentual de melhora para o parâmetro flacidez para a pele facial com 30 dias de avaliação.

Após 60 dias de início, o grupo A obteve nota 9-10 em 40,74% das pacientes avaliadas (Figura 29).



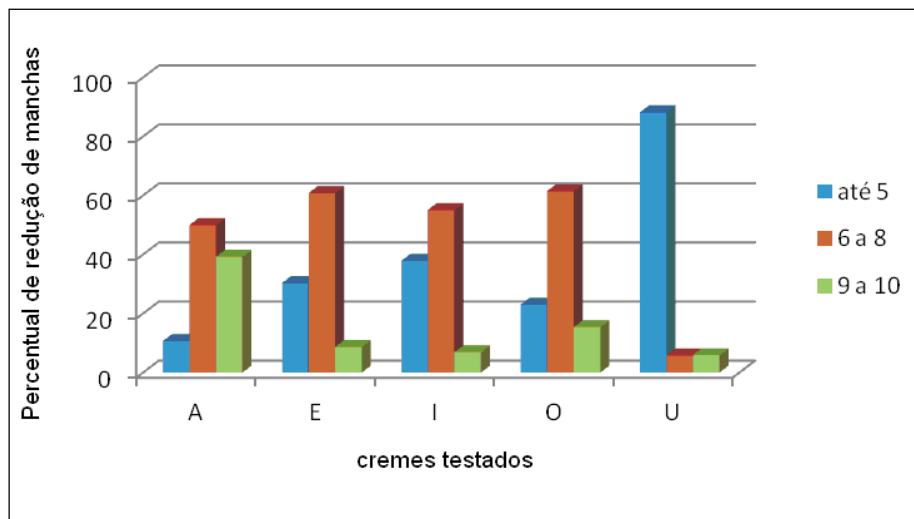
**Figura 29:** Percentual de melhora para o parâmetro flacidez para a pele facial com 60 dias de avaliação.

Após 90 dias de início de uso destacam-se os resultados do grupo O e A, onde 57,69% e 48,15% tiveram melhora na flacidez observada respectivamente (Figura 30).



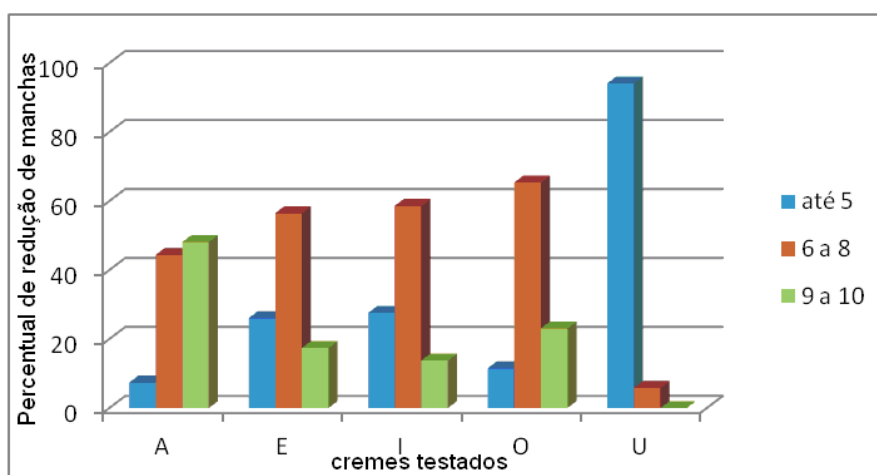
**Figura 30:** Percentual de melhora para o parâmetro flacidez para a pele facial após 90 dias de avaliação.

O terceiro parâmetro avaliado foi melhora na redução das manchas na pele. Observou-se no grupo A que houve uma melhora de 6 a 8 em 40,74 dos pacientes avaliados, com 30 dias de uso (Figura 31).



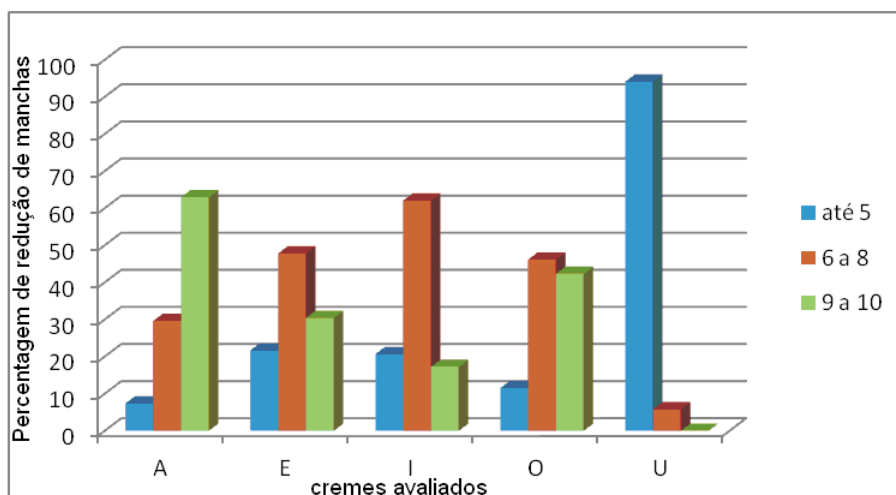
**Figura 31:** Percentual de redução de manchas na pele facial com 30 dias de avaliação.

Após 60 dias de teste 60% das avaliações da formulação O, tiveram pontuação entre 6 e 8. A formulação A teve avaliação entre 9 e 10 para 45% dos casos. A formulação U teve 90% das avaliações abaixo de cinco (Figura 32).



**Figura 32:** Percentual de redução da presença de manchas na pele facial com 60 dias de avaliação.

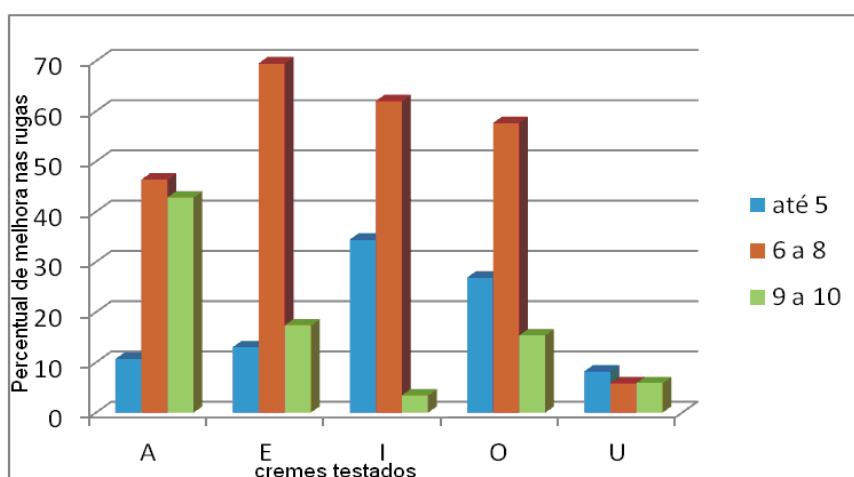
Após 90 dias de início de uso 62,96% do grupo A relataram melhora de 9-10 nas manchas da pele. No grupo O obteve 42,31% de melhora nota 9-10 (Figura 33).



**Figura 33:** Percentual de redução da presença de manchas na pele facial com 90 dias de avaliação.

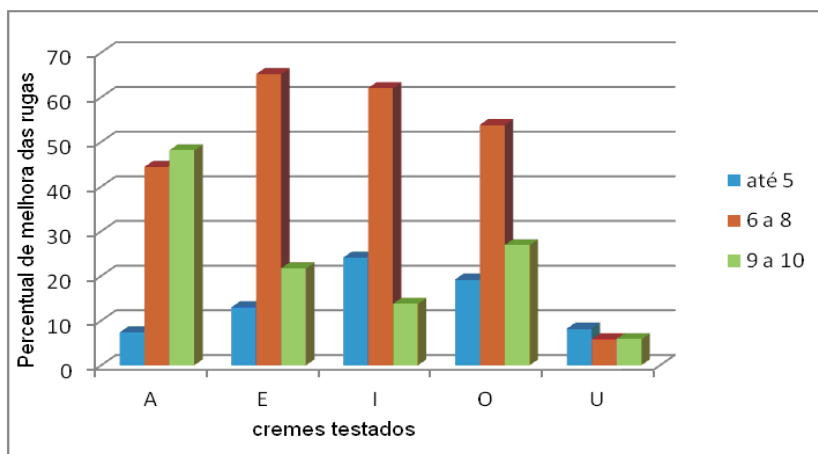
O quarto parâmetro avaliado foi melhora nas rugas com 30, 60 e 90 dias.

Na avaliação da melhora das rugas os pacientes do grupo A relatou 42,86% de melhora após 30 dias de uso (Figura 34).



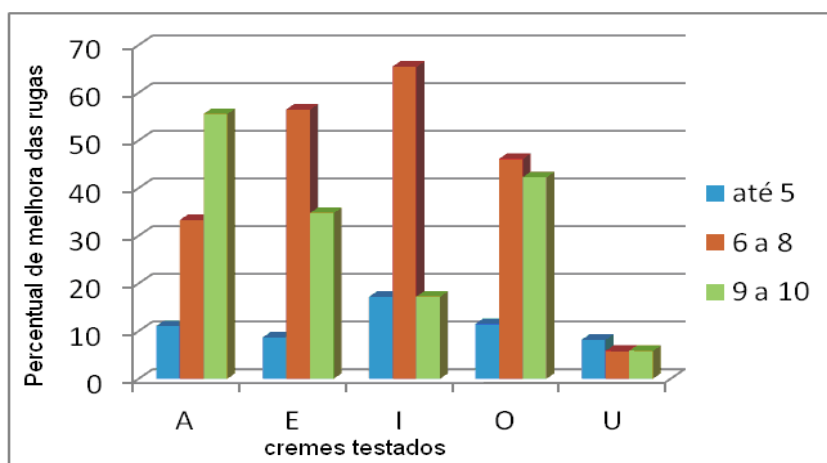
**Figura 34:** Percentual de melhora da presença de rugas na pele facial com 30 dias de avaliação.

Na avaliação aos 60 dias as formulações E e I tiveram maior número de avaliações entre 6 e 8 com 65 e 60% respectivamente. A formulação A teve 45% das avaliações entre 9 e 10 (Figura 35).



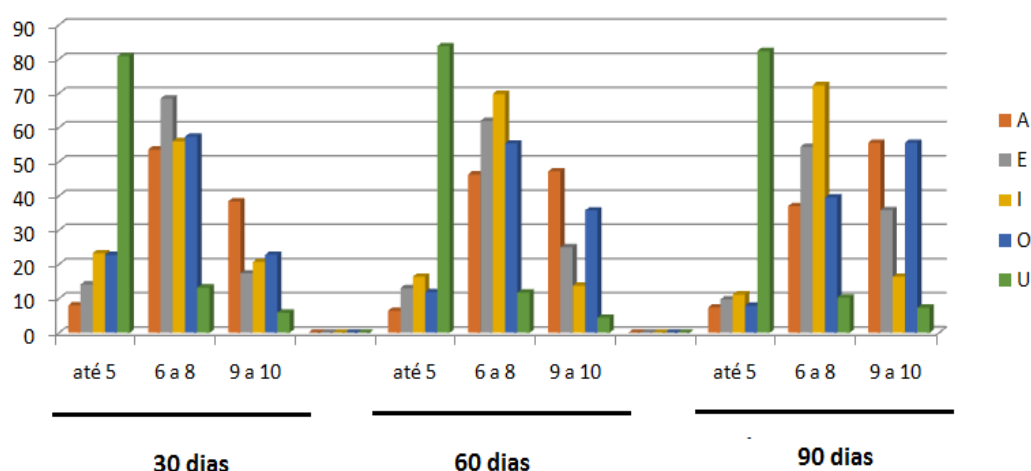
**Figura 35:** Percentual de melhora da presença de rugas na pele facial com 60 dias de avaliação.

Na avaliação aos 90 dias uso dos dermatocosméticos os pacientes relataram que houve melhora nas rugas de 55,56% para o creme A e de 42,31% para o creme O (Figura 36).



**Figura 36:** Percentual de melhora da presença de rugas na pele facial com 90 dias de avaliação.

Para verificar o desempenho das quatro formulações foi realizado o somatório de todos os parâmetros avaliados (Figura 37), mantendo-se as avaliações abaixo de 5, entre 6 a 8 e entre 9 e 10. Verificou-se que a formulação O teve nota acima de 6 a 8 nos tempos 30 e 60 dias e em 55% e notas 9 e 10 após 90 dias. A formulação I teve avaliação entre 6 a 8 em 50% após 30 dias e 70% após 90 dias. A formulação U teve o pior desempenho em todos os parâmetros avaliados ficando com notas abaixo de 5 em 80% todos os períodos avaliados. Esse resultado já era esperado, pois se tratou pacientes apenas com creme base, sem nenhum componente bioativo presente.



**Figura 37:** Resultado do somatório de todos os parâmetros avaliados para as formulações A a O em comparação com a formulação controle (U).

## 5.9. ANÁLISE QUANTITATIVA

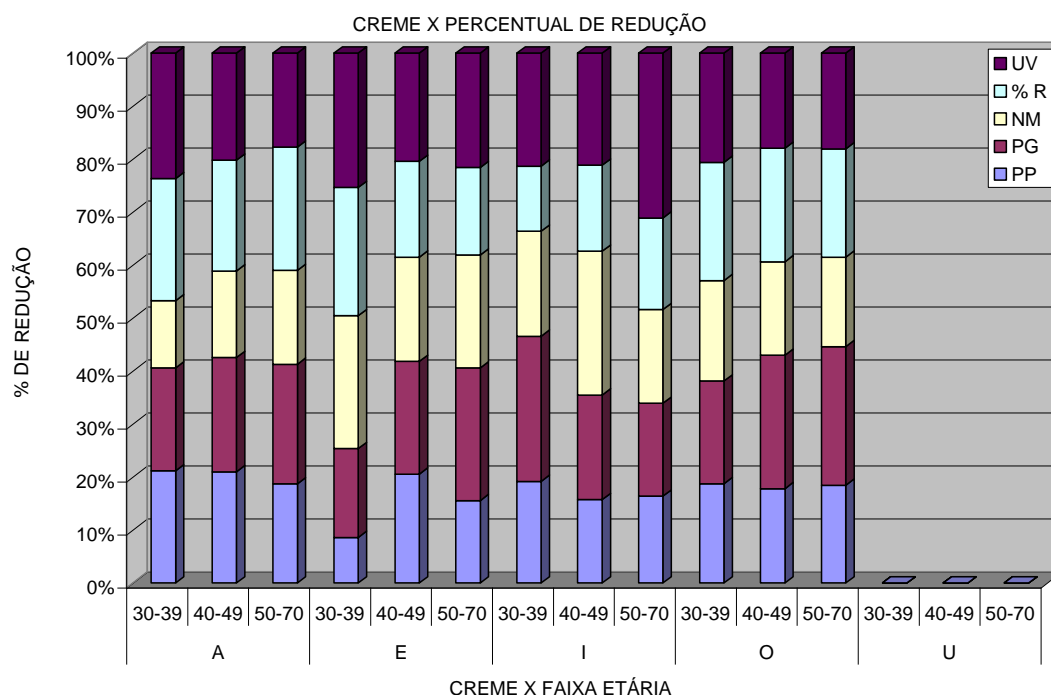
Foram realizadas análises quantitativas em equipamento “quick vision” que é empregado para análises dermatológicas objetivas.

Foram avaliados os parâmetros:

- 1- Poros, com as variáveis: redução de poros pequenos (PP) ou grandes (PG);
- 2- Manchas com três variáveis sendo número de manchas (NM), redução do percentual de manchas (PM) e redução de manchas UV (UV); e

- 3- Rugas, com quatro variáveis: volume de rugas (VR), profundidade de rugas (PR), área de rugas (AR), redução da porcentagem da área das rugas (%R).

Com relação à redução de poros pequenos (PP) verificou-se que para o creme E, na faixa etária 30 a 39 anos, foi o que teve menor desempenho (15,73%). O melhor desempenho foi obtido com o creme A na faixa 40 a 49 anos (58,49%) (Figura 38). Com relação à redução de poros grandes o melhor desempenho ficou em 72,1% para a faixa etária de 50-70 anos para o creme O. Para o parâmetro redução de manchas todos os cremes tiveram percentual de redução significativo em relação à base e para o creme E na faixa 30 a 39 foi de 48,3%. O percentual de redução de manchas variou de 17,74 a 63,35%. As manchas UV também tiveram redução em todas as formulações com maior percentual (65,1%) para o creme A. Todos os percentuais de redução para cada parâmetro avaliado são mostrados na tabela 2.



**Figura 38:** Avaliação da redução dos parâmetros poros pequenos (PP) poros grandes (PG), número de manchas na pele (NM), percentual de redução de manchas e manchas ultravioleta (UV) em face de pessoas das faixas etárias de 30 a 70 anos. Os indivíduos foram divididos em três faixas etárias (30 a 39; 40 a 49 e 50 a 70 anos). Quatro formulações A, E, I e O foram avaliadas e comparadas frente ao um controle negativo (U).



Os resultados dos cremes, versus o fototipo do paciente segundo a classificação de Fitzpatrick são apresentados nas tabelas 4 a 6. Os resultados foram comparados entre o dia zero com dados obtidos após 60 dias de tratamento. Os valores foram submetidos a testes de normalidade. Quando o teste de normalidade foi significativo, utilizou-se o teste estatístico Análise da Variância (ANOVA), comparando as médias dos valores. Quando os valores não se distribuíram segundo uma curva normal, foi utilizado o teste não paramétrico KruskalWalis. O software utilizado foi o Assistat versão 7.7.

Quanto à redução dos poros pequenos houve resultado melhor (51 a 60%) em pacientes fototipo I, III e > IV, nos cremes A, E e I. Já para os poros grandes essa mesma característica manteve-se apenas nos cremes E e O.

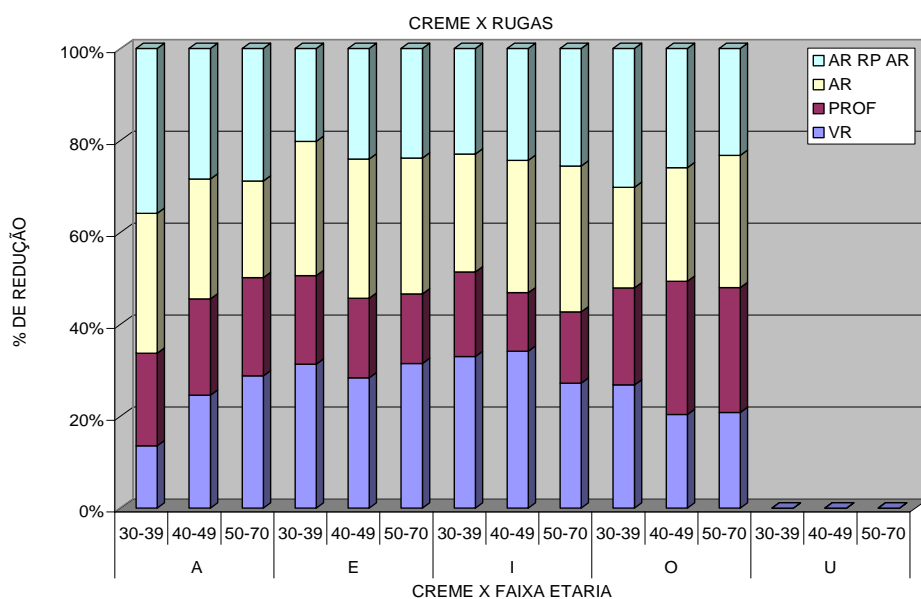
**Tabela 2:** Percentual de redução de diferentes parâmetros avaliados em pele facial de mulheres classificadas em três faixas etárias. As avaliações foram feitas nos dias zero, 30 e 60 dias. Os percentuais de redução, abaixo listados, se referem ao percentual de redução com 60 dias.

Creme	Faixa etária	% de redução de poros		Manchas		
		Pequenos	Grandes	Número	Redução do %	Manchas UV
A	30-39	58,19	53,37	34,85	63,35	65,1
	40-49	58,49	60,02	45,59	58,2	56,38
	50-70	51,00	61,65	48,3	63,52	48,42
E	30-39	15,73	30,73	45,95	44,32	46,47
	40-49	40,93	42,43	39,22	36,02	40,73
	50-70	29,30	47,22	40,19	31,18	40,75
I	30-39	27,65	39,53	28,58	17,74	30,77
	40-49	27,26	34,15	46,99	28,08	36,66
	50-70	29,10	31,26	31,44	30,75	55,35
O	30-39	46,40	48,1	46,96	55,36	51,1
	40-49	46,50	65,9	46,09	55,97	47
	50-70	50,80	72,1	46,48	56,30	49,81
U	30-39	2,25	1,67	2,20	4,34	0
	40-49	0,88	5,07	2,84	0	0
	50-70	0,25	0,95	0,63	0	0

Na avaliação dos parâmetros Rugas foram determinados: percentual de rugas (PR), área de rugas (AR), profundidade de rugas (PROF) e volume das rugas (VR) para todos os cremes. Todos os cremes tiveram bom desempenho (Figura 39). Destaca-se a redução do volume rugas em 67,13 para o creme I; redução de 50% de rugas para os cremes A e O; redução da área de rugas acima de 60% para os cremes A e E. Verificou-se redução da porcentagem da área das rugas em 75% para o creme A. Todos os percentuais de redução são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Percentual de redução dos parâmetros volume, profundidade, área de rugas e redução do percentual de rugas, avaliados para quatro biocremes frente ao grupo controle. Os percentuais referem-se a avaliação feita com 60 dias.

Grupo	Faixa etária	Volume rugas	Profundidade de rugas	Área de rugas	Redução do % de área das rugas
A	30-39	27,91	41,78	62,9	74,12
	40-49	58,65	49,91	62,27	67,83
	50-70	67,3	49,9	49,2	67,46
E	30-39	64,79	39,94	60,39	41,83
	40-49	54,75	33,51	58,61	46,47
	50-70	60,91	29,31	57,33	46,21
I	30-39	42,82	23,97	33,36	29,87
	40-49	67,13	25,08	56,7	47,94
	50-70	49,24	28,03	57,57	46,25
O	30-39	45,62	35,97	37,39	51,45
	40-49	32,41	46,16	39,42	41,24
	50-70	37,12	48,5	51,32	41,44
U	30-39	8,55	4	0	0
	40-49	2,5	3,18	0	0
	50-70	0,52	0,27	0	0



**Figura 39:** Avaliação da redução do parâmetro rugas na face de pessoas das faixas etárias de 30 a 70 anos. Os indivíduos foram divididos em três faixas etárias (30 a 39; 40 a 49 e 50 a 70 anos). Quatro formulações A, E, I e O foram avaliadas e comparadas frente ao um controle negativo (U). Os parâmetros avaliados foram volume de rugas (VR), profundidade de rugas (PROF), área de rugas (AR), redução da porcentagem de área das rugas (ARRPAR).

**Tabela 4:** Resultados dos cremes versus o fototipo dos pacientes segundo a classificação de Fitzpatrick, quanto à análise dos poros pequenos (PP) e grandes (PG).

Poros	CREMES										
	Percentual de redução										
	Fitzpatrick	A	*	E	*	I	*	O	*	U	*
Pequenos	I e II	57,55	a	34,47	ab	23,65	b	45,58	a	2,51	b
	III	51,06	a	23,39	b	32,51	b	50,19	a	1,03	c
	>IV	59,78	a	38,24	b	49,30	ab	47,6	ab	1,026	c
Grandes	I e II	69,38	a	38,86	a	49,20	a	58,21	a	1,67	b
	III	58,28	a	37,51	a	39,62	a	61,81	a	0,75	b
	>IV	53,34	a	47,39	a	48,86	a	65,31	a	5,41	b

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Na avaliação do fototipo com relação ao parâmetro mancha no creme A, observou-se uma melhor resposta no fototipo I e II, tanto na redução do número de manchas (51,55% de redução), na redução percentual de manchas (72,63) e na redução das manchas ultravioletas (67,79) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Resultados dos cremes versus o fototipo segundo a classificação de Fitzpatrick, quanto à análise das manchas.

Manchas	Percentual de redução										
	Fitzpatrick	A	*	E	*	I	*	O	*	U	*
Número	I e II	51,55	a	43,41	a	37,63	a	42,77	a	2,48	b
	III	42,15	a	40,99	a	28,23	a	47,07	a	0,15	b
	>IV	40,03	a	43,55	a	42,52	a	50,62	a	3,35	b
(%)	I e II	72,63	a	37,81	b	31,02	bc	51,66	ab	4,35	c
	III	59,37	ab	39,31	ab	38,18	b	64,23	a	0,21	c
	>IV	55,29	a	52,55	ab	29,60	a	55,34	a	0	b
UV	I e II	67,79	a	52,91	a	56,84	a	37,28	ab	6,38	b
	III	62,71	a	64,43	a	46,15	a	38,89	ab	1,55	b
	>IV	56,02	ab	63,09	a	59,70	ab	33,61	bc	5,42	c

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Para a comparação do fototipo segundo a classificação de Fitzpatrick e redução de Rugas verificou-se que o creme A, teve melhor resposta no fototipo I e II, tanto na redução do volume (63,23%), da área (55,63%), na redução percentual total das rugas (62,04%). Com relação à profundidade das rugas o melhor resultado foi obtido no grupo III (72%). O creme E teve desempenho

acima de 60% no quesito volume de rugas para os fototipos I / II, III e IV (Tabela 6).

**Tabela 6:** Resultados dos cremes versus o fototipo segundo a classificação de Fitzpatrick, quanto a análise das Rugas.

Rugas	Fitzpatrick	Percentual de redução									
		A	*	E	*	I	*	O	*	U	*
VR	Iell	63,23	a	63,52	a	64,15	a	44,5	ab	1,9	b
	III	53,06	a	64,22	a	52,65	a	44,78	a	1,58	b
	>IV	57,34	a	64,34	a	57,40	a	37,89	a	0,15	b
Área	Iell	55,63	a	28,35	bc	32,87	ab	43,66	ab	4	c
	III	46,34	ab	47,49	a	30,22	ac	43,14	abc	0,2	d
	>IV	39,52	a	33,75	a	36,09	a	42,96	a	3,7	b
Profundidade	Iell	69,65	a	46,19	ab	56,07	a	55,89	ab	5	b
	III	72,00	a	49,76	ab	39,82	b	35,35	b	0	c
	>IV	65,01	a	38,51	ab	55,71	a	39,73	ab	0	b
% Área das Rugas	Iell	62,04	a	37,91	a	58,25	a	44,8	a	0,37	b
	III	53,12	a	48,8	a	37,82	a	55,43	a	0	b
	>IV	52,68	a	43,8	a	38,00	a	46,52	a	0,39	a

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A avaliação dos resultados dos cremes versus a classificação de Glogau são apresentados nas tabelas de 7 a 9. Os resultados representam a comparação do dia zero o com os obtidos após 60 dias do tratamento. Os valores foram submetidos a testes de normalidade. Quando o teste de normalidade foi significativo, utilizou-se o teste estatístico Análise da Variância (ANOVA), comparando as médias dos valores. Quando os valores não se distribuíram segundo uma curva normal, foi utilizado o teste não paramétrico KruskalWalis. O software utilizado foi o Assistat versão 7.7.

Para o parâmetro poros pequenos (PP) o creme A teve o melhor desempenhos co redução acima de 50% para todos os fototipos. Para os poros grandes (PG) os cremes A, E e O tiveram desempenho de até 70% (Tabela 7).

Com relação aos resultados obtidos para redução de manchas na pele na calssificação Glocau, verificou desempenho similar entre os cremes A, E, I, O para o fototipo III com relação ao número de manchas. Com relação ao percentual de redução de manchas o creme A reduziu 83,32% e manchas UV o mesmo creme teve redução de 68,50% (Tabela 8).

**Tabela 7:** Resultados dos cremes versus o tipo de pele pela classificação de Glogau, quanto a análise de poros (pequenos e largos).

Cremes											
Poros	Glogau	A	*	E	*	I	*	O	*	U	*
Pequenos	I e II	55.51	a	37.52	b	33.25	b	45.54	ab	1.87	c
	III	58.37	a	28.19	b	39.54	b	44.04	ab	0	c
	>IV	54.22	a	34.39	ab	28.51	b	52.54	ab	0.37	c
Grandes	I e II	60.54	a	35.34	b	43.23	ab	52.16	ab	4.09	c
	III	70.89	a	45.08	b	42.24	b	51.69	ab	0.00	c
	>IV	55.62	a	58.25	a	55.64	a	74.36	a	1.68	b

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**Tabela 8:** Resultados dos cremes versus o tipo de pele pela classificação de Glogau, quanto a análise de manchas (número, percentual e UV).

Cremes											
Manchas	Glogau	A	*	E	*	I	*	O	*	U	*
Número	I e II	44.08	ab	42.10	ab	32.29	b	50.74	a	1.78	c
	III	46.09	a	46.41	a	35.01	a	41.36	a	0.83	b
	>IV	60.12	a	35.01	ab	49.23	a	47.47	a	0.32	b
(% )	I e II	56.51	a	46.32	a	24.16	b	54.71	b	2.17	c
	III	61.95	a	40.58	a	39.43	a	55.16	a	0	b
	>IV	83.32	a	53.44	a	48.35	a	58.45	a	0.46	b
UV	I e II	68.50	a	56.71	ab	50.38	ab	38.27	b	6.52	c
	III	54.46	ab	62.67	a	57.48	ab	33.15	bc	2.38	c
	>IV	67.22	a	69.85	a	53.08	a	36.25	ab	1.93	b

\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

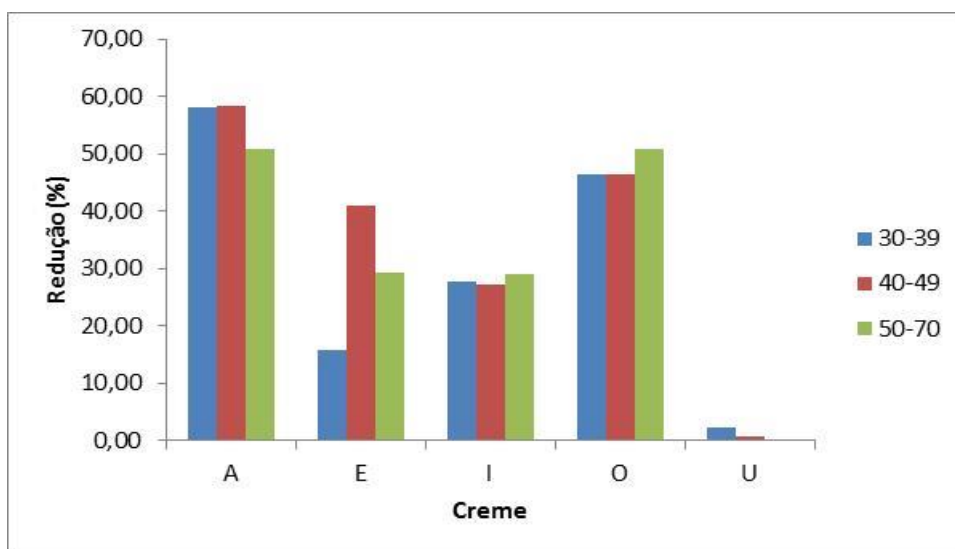
Quanto a redução dos parâmetros estudados para Rugas (volume de rugas, área, profundidade e % de área) o creme A teve o melhor desempenho em todos os fototipos (Tabela 9).

**Tabela 9:** Resultados dos cremes versus o tipo de pele pela classificação de Glogau, quanto a análise de Rugas

Cremes											
Manchas	Glogau	A	*	E	*	I	*	O	*	U	*
VR	I e II	67.69	a	61.49	ab	52.00	ab	37.34	b	2.70	c
	III	62.39	ab	68.80	a	59.70	ab	39.46	b	8.33	c
	>IV	71.26	a	59.67	a	61.58	a	58.07	a	6.71	b
Área	I e II	46.71	a	34.38	ab	24.82	b	39.05	ab	4.22	c
	III	50.32	a	39.49	a	39.37	a	43.13	a	0	b
	>IV	46.84	a	33.93	ab	39.10	a	48.51	a	6.69	b
Profundidade	I e II	73.60	a	38.09	b	32.22	b	39.95	b	2,50	c
	III	66.44	a	56.36	a	70.42	a	43.36	a	0	b
	>IV	76.37	a	26.72	a	58.71	a	39.27	a	0	a
Área das Rugas	I e II	53.78	a	45.14	ab	34.22	b	50.98	ab	0.42	c
	III	54.56	a	43.21	a	56.53	a	43.73	a	0	b
	>IV	59.28	a	40.78	a	41.77	a	47.22	a	0	b

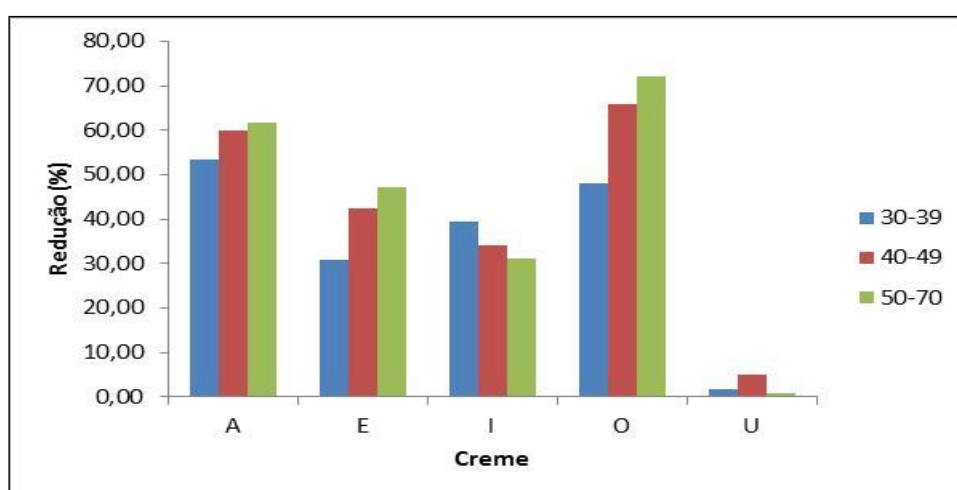
\* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A avaliação do desempenho dos cremes também foi realizada por faixa etária. Para o parâmetro poros pequenos verificou-se que o creme A teve ação similar (60%) entre as faixas 30-39 e 40 a 49. Os cremes A e O tiveram desempenho similar na faixa 50 a 70 anos (Figura 40).



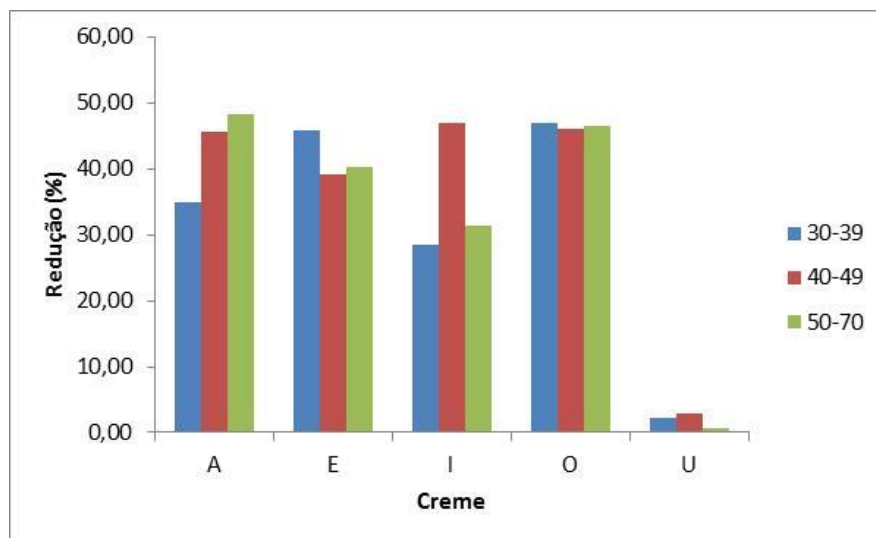
**Figura 40:** Percentual de redução de Poros Pequenos por faixa etária para as diferentes formulações.

Na avaliação da redução de poros grandes o melhor desempenho foi obtido para o creme O com redução de 70% para faixa etária de 50 a 70 anos (Figura 41).



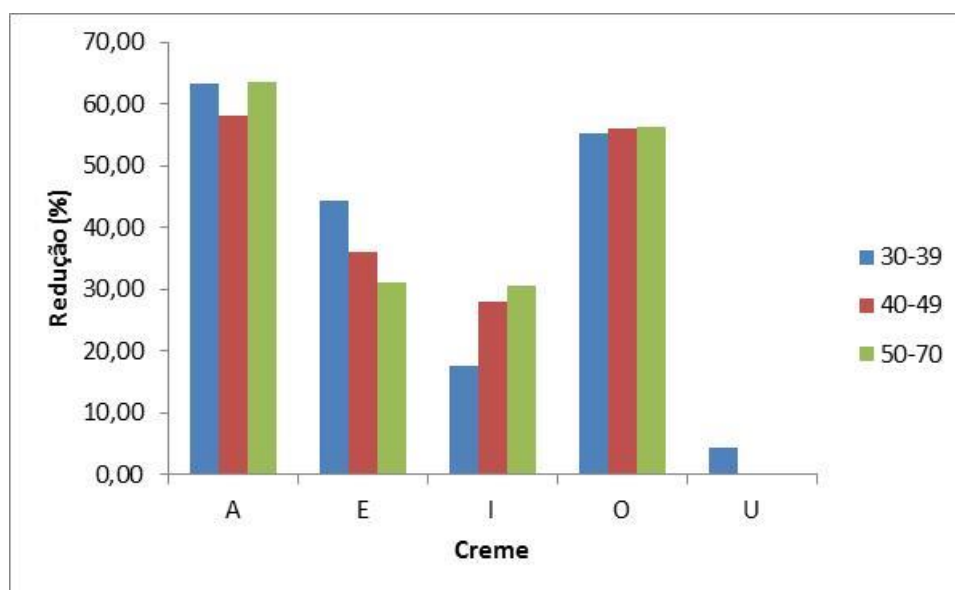
**Figura 41:** Percentual de redução de Poros Grandes por faixa etária para as diferentes formulações.

Os cremes A a O tiveram bom desempenho no percentual de redução do número de manchas. Todas as faixas etárias tiveram redução do número de manchas para o creme O (Figura 42).



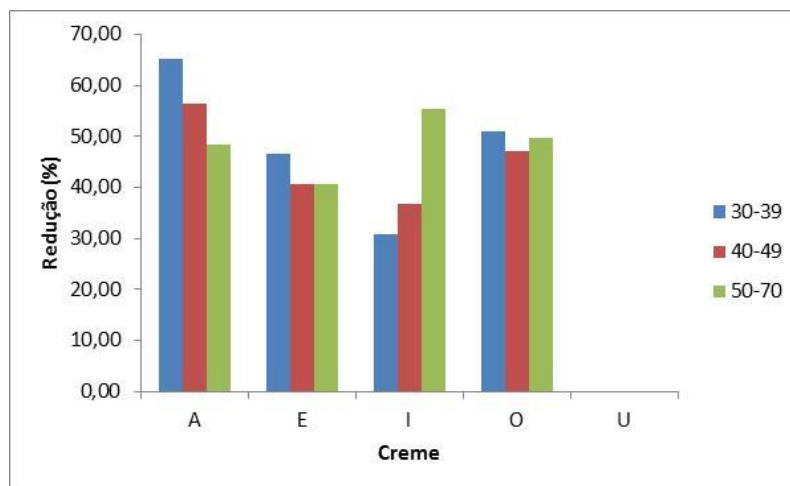
**Figura 42:** Percentual de redução do número de manchas por faixa etária para os cremes A, E, I, O em comparação com a base utilizada para produção dos cremes.

Para o parâmetro percentual de manchas os melhores desempenhos foram obtidos para os cremes A e O em todas as faixas etárias (Figura 43).



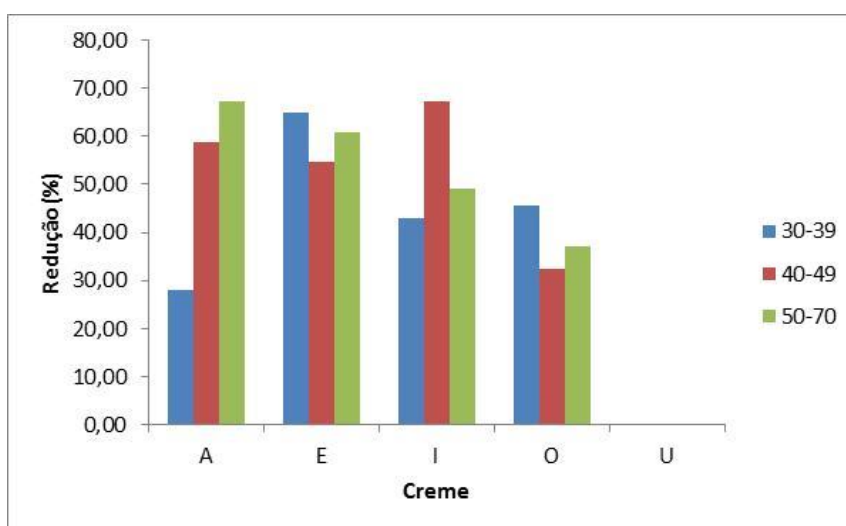
**Figura 43:** Redução do percentual de manchas para os cremes A, E, I, O em relação ao creme controle negativo em que foi usado apenas a base sem nenhum princípio ativo.

O percentual de áreas com manchas teve redução em todos os cremes avaliados quando comparado ao controle negativo. O melhor resultado foi obtido para a faixa de 30 a 39 anos para o creme A e de 50 a 70 anos para o creme I (Figura 44).



**Figura 44:** Redução de Manchas UV para os cremes A, E, I, O em comparação ao controle negativo, quando avaliados por faixa etária.

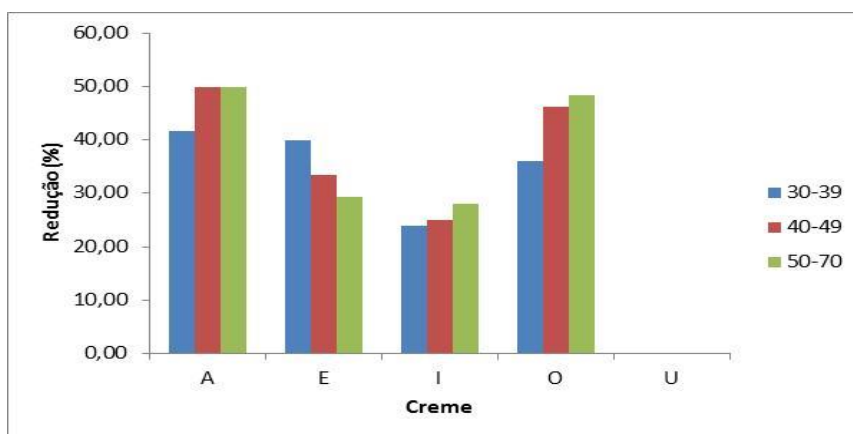
Quanto a redução dos percentuais de volumes das rugas todos os cremes tiveram bom desempenho. Para o creme A, a faixa etária que teve melhor resultado foi de 50 a 70 anos, para o creme E foi a faixa 30 a 39. Para o creme I a faixa etária 40 a 49 anos teve redução de rugas próximo de 70% (Figura 45).



**Figura 45:** Redução do percentual de volume de rugas para pacientes de diferentes faixas etárias. Redução de Manchas UV para os cremes A, E, I, O em comparação ao controle negativo, quando avaliados por faixa etária.

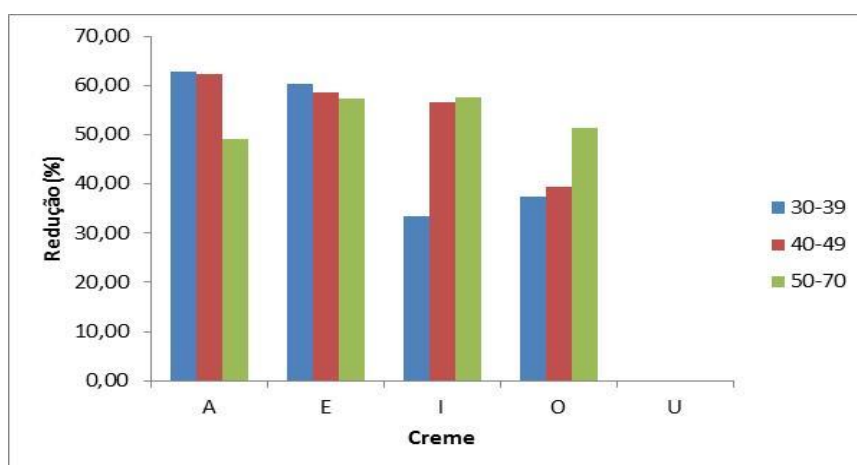


Os cremes A e O tiveram bons resultados para o parâmetro profundidade de rugas. Para o creme A as faixas etárias 30-39 e 40 a 49 tiveram 50% de redução. Já para o creme O as faixas etárias 40 – 49 e 50 a 70 tiveram redução de profundidade acima de 50% (figura 46).



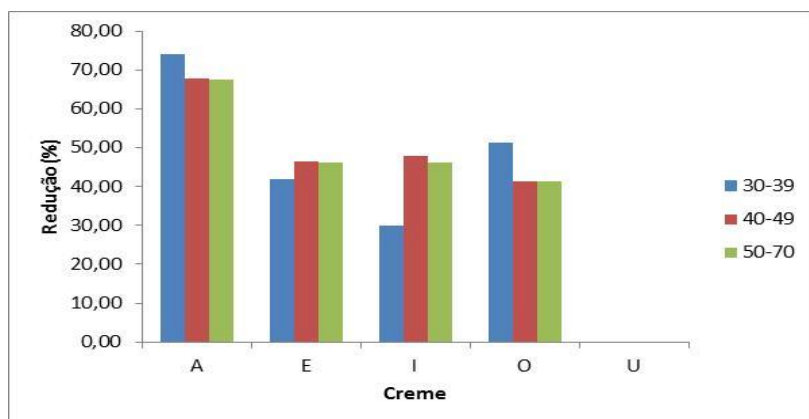
**Figura 46:** Redução da Profundidade das rugas para os cremes A, E, I, O em comparação ao grupo controle (U), por faixa etária.

Para o parâmetro de redução de Área de rugas todos os cremes tiveram bom desempenho. Apenas as faixas etárias 30-39 e 40 -49 tiveram desempenho entre 30 e 40% (Figura 47).



**Figura 47:** Redução da Área das Rugas para os cremes A, E, I, e O em relação ao controle negativo e por faixa etária.

O desempenho do parâmetro Redução percentual área das rugas foi melhor para o creme A na faixa etária 30 a 39 anos (Figura 48).



**Figura 48:** Redução percentual área das rugas para os cremes A, E, I e O em relação ao controle negativo e para três faixas etárias.

Todos os valores dos diferentes parâmetros avaliados por faixa etária são dados na tabela 10.

**Tabela 10:** Redução de diferentes parâmetros por faixa etária

Cremes												
parâmetros		idade	A	*	E	*	I	*	O	*	U	*
Poros	Pequenos	30-39	58,19	a	25,12	bc	27.65	bc	45.93	ab	2,51	c
		40-49	58.49	a	40.93	b	35.49	b	46.49	ab	0.88	c
		50-70	50.99	a	29.94	a	36.77	a	50.81	a	0.25	b
	Grandes	30-39										
		40-49	53.37	a	30.74	ab	39.53	ab	48.94	a	1,67	b
		50-70	60.02	a	42.43	a	50.81	a	65.86	a	4,97	b
		50-70	63.37	a	47.23	a	44.42	a	72.08	a	0.74	b
Manchas	Número	30-39	41.99	a	45.94	a	28.58	ab	44.57	a	2.93	b
		40-49	45.59	a	39.92	a	46.94	a	46.09	a	2.44	b
		50-70	48.48	a	40.20	a	31.45	a	46.48	a	-3,35	b
	(%)	30-39										
		40-49	63.35	a	86.37	a	17.75	b	55.36	a	4,35	b
		50-70	58.02	a	49.92	ab	28.73	b	59.72	a	0	c
	UV	30-39	63.28	a	31.18	bc	41.59	ab	56.29	ab	0.31	c
		30-39	57.91	a	64.79	a	41.59	ab	45.62	ab	8.56	b
	40-49	58.61	a	54.77	ab	67.12	a	29.16	bc	2.69	c	
	50-70	67.30	a	60.91	a	49.24	a	37.12	ab	1.83	b	
Rugas	VR	30-39										
		40-49	62.88	a	60.30	a	33.36	ab	37.40	ab	3.38	b
		50-70	62.28	ab	73.29	a	56.77	ab	41.89	b	3.93	c
	Área	30-39	70.76	a	57.34	a	53.57	a	51.23	a	8.41	b
		30-39	41.78	a	39.94	a	22.61	ab	35.97	a	4,00	b
	Profundidade	40-49	49.96	a	33.51	a	45.08	a	46.44	a	3.63	b
		50-70	47.36	a	39.71	ab	28.03	b	48.65	a	4.46	c
	Área das Rugas	30-39	74.82	a	52.56	ab	29.88	bc	52.03	ab	0	c
		40-49	67.40	a	36.47	ab	47.94	a	40.61	ab	4.08	b
		50-70	67.46	a	46.12	a	46.26	a	41.44	ab	0	b
	30-39	65.10	a	46.47	ab	30.77	b	51.10	ab	0	c	
	40-49	56.38	a	40.73	a	36.66	a	47.20	a	0.60	b	
	50-70	48.42	a	40.70	a	55.33	a	49.82	a	0	b	

\*Nota: Letras minúsculas iguais, na horizontal, não diferem, estatisticamente, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. AÇÃO ANTIOXIDANTE

A pele expressa a ação do envelhecimento intrínseco. E, somado a isso existe o envelhecimento extrínseco, que geralmente está relacionado ao fotoenvelhecimento e hábitos do indivíduo. Ainda os radicais livres também estão envolvidos nesse processo de envelhecimento, pois a produção de espécies reativas de oxigênio leva a oxidação de moléculas tais como: ácido desoxirribonucléico, lipídeos, proteínas. Nas células os códigos protéicos (DNA e RNAm) são armazenados no núcleo e nas mitocôndrias. O DNA mitocondrial apresenta alta taxa mutagênica, devido a sua proximidade das espécies reativas de oxigênio.

As mutações do DNA mitocondrial foram encontradas em número significativamente maior em peles que sofreram foto exposição solar do que naquelas que não são expostas. A radiação ultravioleta-A tem sido responsabilizada pelo dano do DNA mitocondrial. Essa radiação age diretamente gerando espécies reativas de oxigênio que lesam o DNA mitocondrial. Em contrapartida existem enzimas, como a superóxido dismutase, que tentam promover um balanço positivo nesse processo. A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células fotoexpostas (Berneburg et al. 2004).

O produto ATIVO 1 foi capaz de elevar significativamente ( $P < 0,01$ ) a atividade da enzima superóxido dismutase. Observa-se que na concentração de 6,25%, o produto-teste é capaz de elevar a atividade de SOD em 100%. Dessa forma, fica evidente a capacidade antioxidante do produto. Tal ativo leva à maior proteção do DNA mitocondrial, com a exposição de fragmentos de pele à irradiação os níveis de antioxidantes são reduzidos significativamente.

Trolox (5, 7, 8-ácido tetramethylchromane-2-carboxílico 6-hidroxi-2), é um análogo que é solúvel em água e age limpando o radical livre  $\alpha$ -tocoferol. Trolox tem vantagens sobre  $\alpha$ -tocoferol, o qual é solúvel em lípidos, porque ele pode ser incorporado tanto na água e os compartimentos lipídicos de células.

**Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)** mede a

capacidade antioxidante de uma determinada substância, em comparação com o padrão, Trolox. Mais comumente, a capacidade antioxidante é determinada por ensaio ABTS (Huang et al. 2005).

Fragmentos de pele submetidos à irradiação tratados com o produto Fórmula 1- tiveram os níveis de antioxidantes, relativos aos padrões de Trolox, aumentados em 100% em comparação ao grupo controle irradiado. Estes resultados demonstram a intensa capacidade antioxidante do produto em teste. Esse biocreme age diretamente promovendo proteção ao foto-envelhecimento celular. Cheng et al. 2013 relatam que o extrato aquoso foi superior quando comparado ao extrato alcoólico na quantidade de polisacarídeos. Também determinam a aceleração da cicatrização de feridas em ratos diabéticos com o uso de extrato aquoso de *Ganoderma*. No presente estudo igualmente utilizamos extrato aquoso mas, para a preparação do biocreme foi utilizado no presente estudo o extrato aquoso dos esporos de *Ganoderma*, proporcionando maior extração de dissacarídeos.

## 6.2. AÇÃO FOTOPROTETORA E PROMOTORA DE COLAGEOGÊNESE:

Produtos reativos de oxigênio, formados pela radiação ultravioleta, ativam fatores de transcrição como a proteína 1 (AP-1) e o fator kB de transcrição nuclear (NF-kB). A AP-1 ativada estimula a transcrição de genes de enzimas desintegradoras da matriz, como as metaloproteínas (MMP1, MMP3, MMP9). Essas metaloproteínas promovem degradação do colágeno. Nesse processo ocorre também redução do colágeno VII, importante componente da junção dermoepidérmica. O NFkB ativado, por sua vez, estimula citocinas inflamatórias (IL1, IL6, TNFa), associados à degradação de colágeno. Além de estar relacionada à degradação de colágeno, a radiação também contribui na redução de sua síntese. A pouca adesão dos fibroblastos ao colágeno alterado também diminui a neocolagênese, levando à fotoenvelhecimento e flacidez (Montagher e Costa, 2009).

Para o presente estudo um simulador de radiação ultravioleta (UVA e UVB) (SOL-500, Honle) foi utilizado para a irradiação dos fragmentos de pele *ex vivo*. A radiação UVC foi reduzida com filtro apropriado. O instrumento foi estabilizado

por, no mínimo, 15 minutos antes da irradiação e a intensidade emitida pelo simulador foi calibrada antes do uso para emissão de 3 J/cm<sup>2</sup>. Após 24 horas de tratamento os fragmentos de pele foram submetidos à irradiação e, em seguida, mantidos por mais 24 horas em contato com o produto-teste.

Observou-se tanto Ativo 1 e Fórmula 1 promovem efeito fotoprotetor estatisticamente significativo. Tais compostos promovem uma proteção à degradação do colágeno, intrínseca à irradiação ultravioleta.

### 6.3. AÇÃO DESPIGMENTANTE

A tirosinase, também conhecida por monofenol monoxigenase, é uma enzima contendo cobre (metaloenzima) que catalisa a oxidação de fenóis, tanto em animais quanto em plantas. Um dos produtos da ação desta enzima é a melanina. A síntese de melanina é explicada pela presença da tirosinase - concentrada no aparelho de Golgi dos melanócitos. O pigmento é originado a partir da polimerização do aminoácido tirosina por intermédio da ação da tirosinase, a qual passa de aminoácido incolor a um pigmento castanho. A tirosina polimerizada deposita-se em vesículas denominadas melanossomas, as quais se deslocam pelos prolongamentos citoplasmáticos dos melanócitos, sendo transferidos para os queratinócitos através de um processo de secreção, denominado secreção citócrina (de célula para célula). Os grânulos de melanina permanecem no citoplasma dos queratinócitos. Isso resulta na mancha da pele.

O produto **ATIVO 1** não exerceu efeitos significativos sobre a síntese de melanina em melanócitos em condição basal nos experimentos *in vitro*. Em contrapartida, mediante exposição à radiação, melanócitos tratados com o Ativo 1 apresentaram níveis de melanina significativamente inferiores ao grupo controle irradiado. Nas faixas de concentrações de 12,50; 6,25 e 3,12 % (v/v), o Ativo 1 foi capaz de reduzir a síntese do pigmento em 39%, 42% e 21%, respectivamente. Os dados apresentados evidenciam a capacidade despigmentante significativa do produto, em substrato biológico mediante exposição à irradiação.

Nos fragmentos de pele submetidos à irradiação e tratados com **a FORMULA 1**, observou-se, no estudo *in vitro*, importante redução dos níveis de

melanina, em relação ao grupo controle irradiado. Tais dados demonstram capacidade fotoprotetora do presente biocreme.

A PAR-2 pertence à uma família de proteínas transmembranas, acoplada a receptores (PAR-1-PAR-4) as mesmas são ativadas por proteases séricas. Na epiderme PAR-2 é expresso em queratinócitos e não em melanócitos, essa proteína está envolvida na regulação da pigmentação da pele através da interação melanócito-queratinócitos. Assim, a modulação da atividade de PAR-2 aumenta ou diminui a transferência dos melanossoma e por sua vez pigmentação da pele. Curiosamente, a expressão de PAR-2 e a indução por irradiação ultravioleta é dependente do tipo de pele, com uma expressão global mais elevada e indução em indivíduos de pele mais escura. Quando testado, *in vitro*, a Formula 1 e atividade PAR 2 mostram que a irradiação sobre os fragmentos de pele foi capaz de elevar o sinal de marcação anti-PAR-2 em comparação ao grupo controle basal. Além disso, observa-se que os fragmentos de pele incubados com o produto **Formula 1** sob condição basal apresentaram evidente aumento dos sinais anti-PAR-2 em comparação ao grupo controle basal. Da mesma forma, nos fragmentos de pele submetidos à irradiação e tratados com **Formula 1**, observou-se aumento da produção de PAR-2 em relação ao grupo controle irradiado (Seiberg, 2001).

#### 6.4. SEGURANÇA E CITOTOXICIDADE

Apesar de não ser desejável, alguns produtos cosméticos podem apresentar reações adversas aos pacientes. Tais efeitos, muitas vezes, podem ser decorrentes de fatores individuais ou até mesmo pelo uso inadequado do produto. Entretanto, os ensaios biológicos para avaliação de segurança devem preceder a colocação do cosmético no mercado. Historicamente, estes ensaios sempre foram realizados *in vivo*, em animais, uma vez que podem ser utilizados para avaliar grande parte dos riscos potenciais envolvidos, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos. Todavia, atualmente alguns centros de pesquisa estão adotando alternativas *in vitro* aos ensaios com animais. O ensaio de citotoxicidade define o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelo material constituinte nos cosméticos. Assim, resultados positivos no ensaio

de citotoxicidade descaracterizam a condição de inocuidade do cosmético, sendo possível causar processos de irritabilidade nos usuários (Demarco et al. 1998).

O Ativo 1: A partir da concentração de 25% (v/v) até a concentração de 0,0008 % (v/v) apresentou citotoxicidade pouco importante ou negligível, mantendo a viabilidade celular próxima ou superior a 100% quando comparada ao controle.

A Fórmula 1: A partir da concentração de 0,195% (v/v) até a concentração de 0,0008 % (v/v) apresentou citotoxicidade pouco importante ou negligível, mantendo a viabilidade celular próxima ou superior a 100% quando comparada ao controle.

## 6.5. ANÁLISES DOS BIOCREMES EM PACIENTES

Iniciou-se o estudo com 150 pacientes que foram divididos em um número de 30 pessoas por grupo. Um total de 129 pacientes terminaram o estudo. Tal redução foi ocasionada por motivos outros que aos determinantes pelo estudo.

### 6.5.1. Perfil Paciente Incluído no Estudo

A Idade média dos pacientes analisados foi de 41,15 anos, a grande maioria era composta pelo sexo feminino, apenas 6,20% era do sexo masculino. O perfil dos pacientes que utilizavam protetor solar, praticavam regularmente atividade física e não tabagistas.

Em relação às classificações de pele 71,29% dos pacientes analisados eram fitzpatrick 1, 2 ou 3. Portanto, fototipo mais claro.

Quanto ao foto-envelhecimento segundo a classificação de Glogau 76,74% das pacientes avaliadas possuía classificação Glogau 2-3: envelhecimento moderado ou avançado- tais como manchas senis, ceratoses, rugas estáticas, discromias, e sulco nasolabial.

Quanto à flacidez facial 85,27% das pacientes apresentava flacidez facial leve ou moderada.

#### 6.5.1.1 Fase Subjetiva

Aplicou-se também um questionário para análise subjetiva quanto ao grau de hidratação da pele, avaliação de melhora ou não de flacidez, análise das rugas finas, manchas e presença de efeito colateral. As pacientes davam nota de 0-10 quanto à melhora da pele após utilização dos biocremes.

##### *Hidratação:*

Quanto à análise da hidratação da pele 51,85% das pacientes que utilizaram creme do grupo A- extrato de *Spirulina* e melatonina deram nota 9-10 para melhora da hidratação da pele após 60 dias de utilização do creme. Sendo que tal número subiu para 55,56% após 90 dias de uso. No grupo O – extrato de *Ganoderma* e melatonina, 73,08% das pacientes deram nota 9-10 para grau de hidratação da pele após 90 dias de utilização desses biocreme. Portanto, tanto o grupo A, quanto o grupo O proporcionaram um aumento significativo na hidratação da pele das pacientes.

##### *Rugas:*

Quanto à análise subjetiva da diminuição de rugas, as pacientes em 55,56% deram nota de 9 a 10 para diminuição de suas rugas ao creme do grupo A-*Spirulina* e melatonina, após 90 dias de utilização do mesmo. Para esse mesmo parâmetro as pacientes do grupo O em 42,31% deram nota 9-10 após 90 dias de utilização do mesmo. No grupo E- 65,22% deram nota de 6-8 quanto à melhora das rugas após 60 dias de uso do creme. Já no grupo I - 65,52% deram nota de 6-8 após 90 dias de utilização do creme.

##### *Manchas:*

Houve uma melhora significativa das manchas segundo as pacientes após a utilização dos biocremes A e O. Os mesmos obtiveram 62,96% e 42,31% de notas 9-10, respectivamente após 90 dias de sua utilização. 92,12 % das pacientes do grupo U (grupo controle) deram notas abaixo de 5 quanto à melhora das manchas. Tal resultado corrobora na hipótese de ação anti-melanogênica dos biocremes, tanto do extrato de *Spirulina*, quanto de *Ganoderma*.



### *Flacidez:*

No grupo A, 48,15% das pessoas atribuíram notas de 9-10 para melhora da flacidez após 90 dias de utilização do creme. Já no grupo O 57,69% classificaram em 9-10 a melhora da flacidez com 90 dias de uso. Tal resultado mesmo que subjetivo corrobora na hipótese de que os agentes antioxidantes desses biocremes, inibam a ação dos produtos reativos de oxigênio, formados pela radiação ultravioleta. Tal inibição diminuiria a expressão tanto da proteína 1, quanto do fator  $\kappa B$  de transcrição nuclear (NF- $\kappa B$ ). Esses fatores são promotores da degradação do colágeno, o que leva à flacidez (Montagher e Costa 2009).

## 6.6. ANÁLISE OBJETIVA

Buscou-se fazer uma análise objetiva dos resultados dos cremes para se ter dados mais completos e fidedignos. Optou-se por trabalhar com o VisioFace® (Courage & Khazaka, Germany) que é um sistema de obtenção de fotos do rosto, em alta definição e resolução. O equipamento possui um sistema com 210 LEDs de luz branca e gera fotos detalhadas da face com 18 mega pixels de resolução. Esse sistema permite um posicionamento da cabeça sempre na mesma posição. O software VisioFace® Quick permite a avaliação de parâmetros de interesse como: manchas, poros e rugas. O software gera uma imagem “tipo UV” para a análise de manchas de envelhecimento. Pena Ferreira e colaboradores, avaliaram 12 produtos comerciais, com efeito anti-rugas, utilizando como método o VisioFace®. Esses autores concluíram que essa metodologia pode ser considerada útil para o estudo direto da superfície da pele e pode ser apropriado como um método de rotina na avaliação de ruga (Pena Ferreira et al. 2010).

Utilizando esse software, no presente estudo, observou-se redução estatisticamente significativa em todos os parâmetros avaliados, para o creme A (extrato de esporos de *Spirulina* e melatonina). Houve redução em média de 58,0% dos poros pequenos, 61,0% para poros grandes. Na variável, manchas houve redução média de 56,6% para manchas ultravioletas, 48,3% de redução no número total e 63,5% de redução no percentual geral das mesmas. Tal

resultado foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle.

O dermocreme O (extrato de *Ganoderma* e melatonina) também se destacou. Observou-se em média redução de 47,9% dos poros pequenos, 62,1% de poros largos, 46,4% no número de manchas, 55,9% de redução do percentual de manchas e 49,3% de redução de manchas ultravioletas.

O grupo E (extrato de *Ganoderma* extrato de *Spirulina* e melatonina) apresentou resultado após 60 dias de uso, com redução de 40,12% de poros largos, 41,78% no número de manchas, 37,17% de redução percentual de manchas e 42,65% de redução de manchas ultravioleta.

O grupo I (que continha apenas melatonina), foi o grupo com resultados menos significativos em relação aos demais, demonstrando que a sua ação é adjuvante aos outros biocomponentes contidos nos extratos tanto de *Ganoderma*, quanto de *Spirulina*. O resultado que se destacou foi a redução de manchas ultravioleta. Houve redução nesse grupo para este quesito em 40,92%.

A melatonina age como um potentíssimo agente antioxidante e varredor de radicais livres (Tan et al. 2002). Além disso a melatonina age como um fator protetor contra os danos induzidos pela radiação UV na pele (Fischer et al. 2008b, Slominski et al. 2005a; 2008a). *In vitro*, a melatonina aumentou a viabilidade celular em fibroblastos irradiados com UV (Lee et al. 2003), e diminuiu a apoptose celular (Ryoo et al. 2001). A melatonina também promoveu proteção aos leucócitos humanos contra os danos induzidos por UV, suprimir significativamente a formação de ROS. Sendo que sua ação tinha propriedades de eliminação de radicais livres ainda mais fortes do que a vitamina C e Trolox (Fischer et al. 2002).

## 6.7. ANÁLISE RESULTADOS BIOCREMES QUANTO ÀS FAIXAS ETÁRIAS

### 1. Poros:

Os poros têm um importante papel na fisiologia da pele, uma vez que providenciam a abertura para três glândulas diferentes, nomeadamente as apócrinas (desenvolvem-se na puberdade), as écrinas (ajudam o corpo a arrefecer) e as sebáceas (segregam sebo e estão associadas ao folículo piloso, através do qual o óleo que produzem chega à superfície da pele, hidratando-a).

Os poros são, normalmente, mais visíveis nas zonas do nariz e testa. As paredes dos poros podem aumentar devido ao entupimento causado pela produção excessiva de sebo e pela acumulação de células mortas à volta dos poros. Por outro lado, o dano solar provoca inflamação, que pode promover a produção de óleo em excesso, bem como enfraquecer o colágeno e elastina das camadas mais profundas da pele que suportam os poros. Por fim, a desidratação aumenta as falhas entre as células, tornando os poros mais evidentes. Assim à medida que envelhecemos, a renovação celular diminui e a hidratação da pele igualmente, tornando a textura da pele irregular. Além disso, a elasticidade da pele diminui, devido à queda do número de fibroblastos, fazendo com que esta fique flácida e com rugas, Os poros são afetados por esta perda de elasticidade e esticam, o que os torna maiores (Glocou, 1996).

Quando se avaliou os resultados da redução de poros pequenos e idade encontrou-se uma redução mais significativa na idade de 40-49 anos, quando foi usado o biocreme A. Nessa faixa etária houve uma redução de 58,49% dos poros pequenos. No biocreme E houve uma redução de 40,93% e no biocreme I de 35,49% de poros pequenos. Apenas no Biocreme O houve melhor resultado para faixa etária 50-70 anos onde a redução foi de 50,81%. Todos os biocremes quando comparados ao grupo controle, cuja redução foi de 0,88% obtiveram resultados estatisticamente significativos.

Segundo Oriá et al (2003), a pele apresenta, com o avançar da idade, diminuição da espessura epiderme-derme; redução da elasticidade e da secreção de sebo pelas glândulas sebáceas; resposta imunológica comprometida; decréscimo do número de glândulas sudoríparas; diminuição do leito vascular com fragilidade dos vasos sanguíneos. Depois dos 30 anos de idade, o número e o tamanho das fibras musculares começam, progressivamente, a reduzir, contribuindo para a diminuição da massa músculo-esquelética. Assim, evidencia-se a necessidade de cuidados específicos para a pele do idoso que atendam às alterações do sistema tegumentar (Oriá et al. 2003).

Quando se avaliou os biocremes versus a faixa etária e poros largos, verificou-se que houve uma redução significativamente maior nos biocremes de A, E e O na faixa etária de 50-70 anos. Portanto, com o avançar da idade a dilatação dos poros é notória. E os biocremes atuando na hidratação e na

formação de colágeno contribuíram para diminuir estatisticamente os poros largos das pacientes avaliadas. Tal diminuição foi significativa em pacientes com idade mais avançada. No grupo A houve 63,37% de redução, no grupo O observou-se uma redução de 72,08%. O grupo controle obteve média de redução em 0,74%. Isso demonstra uma significância com  $p < 0,01$ .

## 2. *Rugas:*

A diminuição de espessura da epiderme e derme e a diminuição da gordura subcutânea manifesta-se fisicamente em rugas. Cerca de 85% das rugas na pele envelhecida deve-se ao envelhecimento extrínseco. Estas caracterizam-se por serem profundas. As rugas finas devem-se ao adelgaçamento da epiderme e da derme superior criando um tipo de tecido parecido com “folha de papel”, resultando em rugas entrecortadas. Estas podem se dividir em rugas estáticas ou dinâmicas (Nazarko, 2005).

Avaliando o resultado dos biocremes versus faixa etária no quesito rugas, houve melhor resultado clínico em faixa etária de 30-39 anos. Nessa faixa etária as rugas são mais superficiais, com menor tempo de instalação, portanto, maior capacidade de reparo. Quando avaliados os Biocremes A, E e O para análise de redução percentual de área de rugas houve redução de 65,10%, 46,46% e 51,10% de redução respectivamente. O grupo controle apresentou 0,60% de redução, o que validou o estudo estatisticamente significativo com  $p < 0,01$ .

A profundidade das rugas também obteve uma melhora significativa, notadamente na faixa etária de 30-39 anos. No grupo A teve uma redução de 74,82% e no grupo O: 52,03% de redução na profundidade das rugas.

## 6.8. ANÁLISE RESULTADOS BIOCREMES QUANTO À CLASSIFICAÇÃO FITZPATRICK

Fitzpatrick classificou a pele em fototipos a partir da capacidade de cada pessoa em se bronzear sob exposição solar e sua sensibilidade e tendência a ficar vermelhas sob os raios solares. Fitzpatrick elaborou sua escala a partir de visualizações empíricas. Ele classificou a pele de cada um como sendo

potencialmente de uma das seis classificações listadas a seguir (grupo, eritema, pigmentação e sensibilidade ao Sol).

Os fototipos possuem características intrínsecas, por exemplo, os fototipos menores- I, II, são peles com maior tendência à ruga, manchas e mais expostas ao fotoenvelhecimento, por possuírem uma menor proteção intrínseca. Já os fototipos mais altos IV, V e VI, possuem uma maior tendência à oleosidade da pele, com poros mais largos e menor tendência á rugas.

Quando avaliado os parâmetros obteve-se uma redução maior de poros grandes e pequenos em fototipos mais altos. O biocreme A proporcionou uma redução de 59,78% de poros pequenos e o biocreme O proporcionou uma redução de 65,31% de poros grandes.

Em relação a manchas os fototipos com maior tendência às manchas são fototipos I e II. Observou-se um resultado significativo quanto à redução de manchas ultravioletas nos fototipos I e II nos biocremes A e O- onde promoveram uma redução de 67,79% e 37,38% respectivamente. Para a redução percentual de manchas também houve uma redução percentual de 72,63%, nos fototipos mais claros quando utilizado o biocreme A.

As rugas são presentes notadamente nos fototipos mais baixos. Sendo que os resultados demonstraram uma maior eficácia na redução percentual das rugas, assim como no seu volume, na sua profundidade e área. Com redução percentual de 62,04%, 63,23% no seu volume, em 55,63% na sua área, quando utilizado o biocreme A. Para o biocreme O obteve-se uma redução de 55,89% na profundidade da ruga nos fototipos mais claros.

#### 6.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS BIOCREMES QUANTO À CLASSIFICAÇÃO GLOGAU

As rugos estáticas surgem na ausência do movimento e representam a fadiga das estruturas que compõem a pele. Com diminuição do colágeno e das fibras elásticas que proporcionam sustentação a gravidade provoca a queda da pele. Com o envelhecimento aparece queda do supercílio e músculos do terço inferior da face. O contorno mandibular é perdido devido à flacidez aparente. Ocorrem o aparecimento do sulco mento-labial e flacidez cervical. O

envelhecimento leva à um aprofundamento do sulco nasogeniano e perda do contorno do zigoma.

As rugae dinâmicas são decorrentes de movimentos repetitivos dos músculos da face. As rugas relacionadas com os músculos são causadas por movimentos repetidos que criam marcas na epiderme e na maior parte da derme.

As rugas podem ser classificadas de acordo com Glogau:

Tipo I: sem rugas

- Fotoenvelhecimento inicial;
- Pequenas mudanças de pigmentação;
- Pele fina, com pouca espessura;
- Rugas mínimas;

Tipo II: rugas em movimento

- Fotoenvelhecimento intermediário/moderado;
- Pequenas manchas marrons na pele;
- Espessura da pele mais grossa em alguns pontos, possível de ser sentida pelo tato, mas invisível;
- Linhas começam a aparecer com o sorriso;

Tipo III: rugas em repouso

- Fotoenvelhecimento avançado;
- Perda de cor e varizes em algumas localizações;
- Pele espessa em alguns pontos, visível;
- Rugas mesmo visíveis quando o rosto está em repouso;

Tipo IV: rugas visíveis.

- Fotoenvelhecimento severo;
- Cor da pele amarelo-acinzentada;
- Enrugado por completo, nenhuma pele normal.

Na análise do efeito dos biocremes versus a classificação de Glogau, obtivemos melhor resposta quanto à melhora das rugas em glogau classe IV. Para o Biocrema A houve no grupo Glogau IV- diminuição de 71,26% do volume das rugas; 76,37% de diminuição da profundidade das rugas e 59,28% de redução na área das rugas. Para os biocremes I e O também houve melhor

resultado para Glogau IV- onde 61,58% e 58,07% de redução de volume de ruga foi encontrado.

Atualmente, tanto no Brasil, como mundialmente, as pessoas estão mais preocupadas em se cuidar. Esse cuidado não se reflete apenas na aparência, mas também em relação à saúde e bem estar. Aliás, beleza, saúde e bem estar estão andando de mãos dadas. O Dermocosmético é um produto com ativos farmacológicos que agem nas partes mais profundas da pele, produzindo melhora de dentro para fora. Eles possuem registro grau 2 na Anvisa, ou seja, são classificados como cosméticos, porém com comprovação científica de seus efeitos e segurança. Tais produtos não possuem corantes nem fragrâncias sendo hipoalergênicos e evitando os xenoestrogênios.

Os biocremes desenvolvidos vêm de encontro à essa nova demanda do mercado, apresentando características antioxidantes espetaculares, promotora da colageogênese, e ação clareadora da pele. Portanto, a biotecnologia aplicada à dermatocosmetologia pode desenvolver produtos de primeira linha e prontos para atender à esse novo mercado do bem estar.

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O ATIVO 1 possui atividade antioxidante importante, aumentando a atividade da enzima superóxido dismutase em até 100 % em culturas de células, em comparação ao grupo controle.
- O ATIVO 1 possui atividade despigmentante, reduzindo a produção de melanina em culturas celulares de melanócitos mediante irradiação.
- O produto FORMULAÇÃO 1 possui atividade antioxidante importante, aumentando a concentração de antioxidantes totais em 100 % em fragmentos de pele, em comparação ao grupo controle irradiado.
- O produto FORMULAÇÃO 1 possui atividade despigmentante importante em fragmentos de pele sob condição basal e mediante irradiação.
- O produto-teste ATIVO 1 é seguro para aplicação em culturas celulares na faixa de concentração que varia de 12,5 a 0,0008 % (p/v), concentrações as quais possuem citotoxicidade negligível ou pouco importante.
- O produto-teste FORMULAÇÃO 1 é seguro para aplicação em culturas celulares na faixa de concentração que varia de 0,0977 a 0,0008 % (p/v), concentrações as quais possuem citotoxicidade negligível ou pouco importante.
- Os biocremes A, E e O – apresentaram uma significativa melhora na hidratação da pele, na redução de manchas e rugas e poros.
- Os biocremes desenvolvidos vêm de encontro à essa nova demanda do mercado, apresentando características antioxidantes e promotora da colageogênese e ação clareadora da pele.
- Portanto, a biotecnologia aplicada à dermato-cosmetologia pode desenvolver produtos de primeira linha e prontos para atender à esse novo mercado do bem estar.



Este trabalho abre novas perspectivas como a utilização de esporos de *Ganoderma* enriquecidos com zinco e selênio que poderiam ter resultados positivos.

Capsulas para utilização via oral de *Spirulina* e esporos de *Ganoderma* adicionando zinco e selênio vêm de encontro a demanda de tratamentos combinando tópico e interno.

Também seria interessante desenvolver loções, tônicos capilares com zinco, selênio e *Spirulina platensis* pois possivelmente seriam bons adjuvantes no tratamento da alopecias.

## REFERÊNCIAS

- Abbott RD, Garrison RJ, Wilson PW, Epstein FH, Castelli WP, Feinleib M, LaRue C. Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes: the Framingham Study. *Arteriosclerosis*. 1983;3:260–272.
- Abdel-Malek Z, Scott MC, Suzuki I, Tada A, Im S, Lamoreux L, et al. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res*. 2000;13 Suppl 8:156-162.
- Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S, Akcali C. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 885:117-133.
- Abdel-Malek ZA, Scott MC, Furumura M, et al. The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes. *J Cell Sci*. 2001;114:1019-1024.
- Abdulqader G, Barsanti L, Tredici M. Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *J Appl Psychol*. 2000;12:493–498.
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res*.30:65–74; 2001.
- Arora D. Mushrooms demystified, 2nd edition. [S.l.]: Ten Speed Press, 1986.
- Bai SK, Lee SJ, Na HJ, Ha KS, Han JA, Lee H, Kwon YG, Chung CK, Kim YM. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Exp Mol Med*. 2005;37:323–334.
- Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, Kastelein JJ, Bittner V, Fruchart JC. Treating to New Targets Investigators. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2007;357:1301–1310.
- Barsh G, Attardi LD. A healthy tan? *N Engl J Med*. 2007; 356:2208-2210.
- Bensky D, Clavey S, Stoger E, Gamble A. *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica*, Third Edition by Dan Bensky, Steven Clavey, Erich Stoger, and Andrew Gamble (2004).
- Berneburg M, Plettenberg H, Medve-König K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Gefeller O, et al. Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. *J Invest Dermatol*. 2004;122:1277-1283.

Bleehen SS, Ebling FJG, Champion RH. Disorders of Skin Color. In: Champion RH, Burton JL, Ebling FJG. Eds Rook / Wilkinson / Ebling textbook of Dermatology. v. 2. Oxford: Blackwell Scientific publications; 1992. p.1561-1512.

Boh B. *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory Drugs. Recent pat anticancer drug discov. 2012 Dec 10.

Bohm M, Metze D, Schulte U, Becher E, Luger TA, Brzoska T. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ. Exp Dermatol. 1999;8:453-461.

Boissy RE. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. Exp Dermatol. 2003;12 Suppl 2:5-12.

Boissy RE. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. Dermatol Clin. 1988;6:161-173.

Bolognia JL, Orlow SJ. Melanocyte biology. In: Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP. Dermatology. v. 1. New York: Mosby; 2003.

Bone K. FNIMH, FNHAA. Medicinal Mushrooms and Cancer.[http://www.crohns.net/Miva/education/articles/Medicinal\\_Mushrooms\\_and\\_Cancel.shtml](http://www.crohns.net/Miva/education/articles/Medicinal_Mushrooms_and_Cancel.shtml).

Caniato R, Filippini R, Piovan A, Puricelli L, Borsarini A, Cappelletti E. "Melatonin in plants". Adv Exp Med Biol 527, 593-597, 2003.

Castelli WP, Wilson PW, Levy D, Anderson K. Cardiovascular risk factors in the elderly. Am J Cardiol. 1989;63:12H–19H.

Cheng PG, Phan CW, Vikineswary Sabaratnam, Noorlidah Abdullah, Mahmood Ameen Abdulla and Umah Rani Kuppusamy. Polysaccharides-Rich Extract of *Ganoderma lucidum* (M.A. Curtis:Fr.) P. Karst Accelerates Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2013, Article ID 671252, 9 pages.

Cherng SC, Cheng SN, Tarn A, Chou TC. Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. Life Sci.;81:1431–1435. 2007.

Chien CC, Tsai ML, Chen CC, Chang SJ, Tseng CH. Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms. Mycopathologia. 166(2),117-120, 2008

Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. Free Radic Biol Med. 2000;28:1815-1826.

Ciferri O, Tiboni O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. Ann Rev Microbiol. 1985;39:503-526.

Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 2000;28:193-202

Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress. *Faseb J.* 2007;2:976-994.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000;18:655-673.

Fischer TW, Slominski A, Zmijewski MA, Reiter RJ, Paus R. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp Dermatol.* 2008;17:713-730.

Fischer TW, Sweatman TW, Semak I, Sayre RM, Wortsman J, Slominski A. Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *FASEB J.* 20:1564–1566; 2006.

Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF: *Dermatology in general medicine. Mc Graw-Hill* 1692, 1695-1993.

Gershwin ME, Belay A, editors. *Spirulina* in human nutrition and health. Boca Raton: CRC Press; 2008.

Glogau RG. Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin. *Semin Cutan Med Surg* 1996;15:134-8.

González R, Rodríguez S, Romay C, Ancheta O, González A, Armesto J, Ramirez D, Merino N. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacol Res.* 39:55–59;1999.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:167-169.

Ha T, Naysmith L, Waterston K, Oh C, Weller R, Rees JL. Defining the quantitative contribution of the melanocortin 1 receptor (MC1R) to variation in pigmentary phenotype. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;994:339-347.

Ha T, Rees JL. Melanocortin 1 receptor: what's red got to do with it? *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:961-964.

Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR. A review on culture, production, and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular.* 2008 N.1034.

Hajjaj H, Macé C, Roberts M, Niederberger P, Fay LB. "Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors". *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (7): 3653-3658. 2005.

- Hearing VJ. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J Dermatol Sci*. 2005;37:3-14.
- Heiss G, Tamir I, Davis CE, Tyroler HA. Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the Lipid Research Clinics Program prevalence study. *Circulation*. 1980;61:302-315.]
- Helton RA, Harrison WA, Kelley K, Kane MA. Melatonin interactions with cultured murine B16 melanoma cells. *Melanoma Res*. 1993;3:403-413.
- Ho YW, Yeung JS, Chiu PK, Tang WM, Lin ZB, Man RY, Lau CS. *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast. *Mol Cell Biochem*. 301(1-2):173-179, 2007.
- Hseu RS, Wang H H, Wang H F, e J M Moncalvo "Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Appl Environ Microbiol*. 62(4): 1354-1363 1996.
- Hsieh TC, Wu JM. Suppression of proliferation and oxidative stress by extracts of *Ganoderma lucidum* in the ovarian cancer cell line OVCAR-3. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(6)1065-1069, 2011.
- Huang, D, Ou B, Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*. 2005, 53, 1841-56.
- Hunt G, Thody AJ. Agouti protein can act independently of melanocyte-stimulating hormone to inhibit melano genesis. *J Endocrinol*. 1995;147:R1-4.
- Ibraheem M, Galbraith H, Scaife J, Ewen S. Growth of secondary hair follicles of the Cashmere goat *in vitro* and their response to prolactin and melatonin. *J Anat* 1994; **185**: 135–142.
- Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the lesional skin of melasma. *Br J Dermatol*. 2002; 146: 165-167.
- Ito S. A chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res*. 2003;16:230-236.
- Jablonski NG, Chaplin G. The evolution of human skin coloration. *J Hum Evol*. 2000;39:57-106.
- Jimbow K, Quevedo Jr WC, Fitzpatrick TB et al. Biology of Melanocytes. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. *Dermatology in General Medicine*. v. 1. New York: Mcgraw-Hill; 1999. p.192-220.
- Jones K, Hughes J, Hong M, Jia Q, Orndorff S. Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res*. 2002;15:335-340.

Jung SM, Kim DS, Ju JH, Shin HS. Assessment of Spirulina-PCL nanofiber for the regeneration of dermal fibroblast layers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2012

Junqueira, LC, Carneiro J. *Histologia Básica* - 12<sup>a</sup> Ed. 2013 Guanabara Koogan,

Kalafati M, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Paschalis V, Theodorou AA, Sakellariou GK, Koutedakis Y, Kouretas D. Ergogenic and antioxidant effects of spirulina supplementation in humans. *Med Sci Sports Exerc.* 2010 42(1):142-151.

Kang HY, Hwang JS, Lee JY, Ahn JH, Kim JY, Lee ES, et al. The dermal stem cell factor and c-kit are overexpressed in melasma. *Br J Dermatol.* 2006;154:1094-1099.

Kang WH, Yoon KH, Lee ES, Kim J, Lee KB, Yim H, et al. Melasma: histopathological characteristics in 56 Korean patients. *Br J Dermatol.* 2002;146:228-237.

Kao PF, Wang SH, Hung WT, et al. Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1,3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *J Biomed Biotechnol.* 2012;673764:1-8.

Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA. *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008:1-4. eCAM.

Katsuura S, Imamura T, Bando N, Yamanishi R. beta-Carotene and beta-cryptoxanthin but not lutein evoke redox and immune changes in RAW264 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:1396-1405.

Khan M, Varadharaj S, Shobha JC, Naidu MU, Parinandi NL, Kutala VK, Kuppusamy P. C-phycocyanin ameliorates doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in adult rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 47:9-20; 2006.

Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Curr Pharm Biotechnol.* 2005;6:373-379.

Kim MH, Kim WY. The change of lipid metabolism and immune function caused by antioxidant material in the hypercholesterolemic elderly women in Korea. *The Korean J Nutrition.* 2005;38:67-75. 137.

Klaus SN, Snell RS. The response of mammalian epidermal melanocytes in culture to hormones. *J Invest Dermatol.* 1967;48:352-358.

Kleszczynski K, Stepnowski P, Skadanowski AC. Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. II. Disruption of mitochondrial bioenergetics. *Toxicol Appl Pharmacol.* 235:182-190; 2009.

Komárek J, Hauer T. Worldwide electronic publication. Univ of South Bohemia and Inst of Botany AS CR; 2009. CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera.

Kobayashi, H. and Paus, R. Expression and functional relevance of melatonin receptors in hair follicle biology. *Exp Dermatol*, 2005;14: 157.

Kulshreshtha A, Zacharia AJ, Jarouliya U, Bhadauriya P, Prasad GB, Bisen PS. *Spirulina* in health care management. *Curr Pharm Biotechnol*. 2008;9:400-405.

Lee SS, Chen FD, Chang, SC, et al. *In vivo* anti-tumor effects of crude extracts from the mycelium of *Ganoderma lucidum*. *J. Chinese Oncology Society* 1984; 5(3): 22-28.

Leeuw SM, Smit NPM, Veldhoven MV, Pennings EM, Pavel S, Simons JWM et al. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 61: 106-113. 2001.

León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res*. 38:1-9;2005.

Lerchl A, Schlatt S. Influence of photoperiod on pineal melatonin synthesis, fur color, body weight and reproductive function in the female Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology*. 1993;57:359-364.

Li EK, Tam LS, Wong CK, Li WC, Lam CW, Wachtel-Galor S, Benzie IF, Bao YX, Leung PC, Tomlinson B. Safety and efficacy of *Ganoderma lucidum* (lingzhi) and San Miao S. Supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot trial. *Arthritis Rheum*, 57(7):1143-50. 2007.

Li YQ, Wang SF. (2006). "Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*". *Biotechnol. Lett.* **28**: 837-841

Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 445:843-850, 2007.

Liddell, H. Scott R. A Greek - English Lexicon (Abridged Edition). United Kingdom: Oxford University Press, 1980.

Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich WD. The pharmacological potential of mushrooms". *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2 (3): 285-299; 2005.

Liu J, Kurashiki K, Shimizu K, Kondo R., "Structure-activity relationship for inhibition of 5 $\alpha$ -reductase by triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*", *Bioorg. Med. Chem.* **14** (24): 8654-8660, 2006

Lu HK, Hsieh CC, Hsu JJ, Yang YK, Chou HN. Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol.* 98(2),220-226. 2006.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233–241.

Manconia M, Pendás J, Ledón N, Moreira T, Sinico C, Saso L, Fadda AM. Phycocyanin liposomes for topical anti-inflammatory activity: in-vitro in-vivo studies. *J Pharm Pharmacol.*;61:423-430; 2009.

Mayzumi F, Okamoto H, Mizuno T. Cultivation of Reishi. *Food Rev Int.* 1997;13:365-73.

Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res.* 1993;15:59-69.

Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Estudo comparativo morfofuncional de melanócitos em lesões de melasma. *An Bras Dermatol.* 2007;82:529-564

Miot LDB, Miot HÁ, Silva, MG, Marques MA. Fisiopatologia do melasma. *An. Bras. Dermatol.* 84 (6), 623-635, 2009.

Mosher DB, Fitzpatrick TB, Ortonne JP, Hori Y. Normal skin color and General Considerations of Pigmentary Disorders. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. *Dermatology in General Medicine.* v. 1. New York: McGraw-Hill; 1999. p. 936-944.

Murisier F, Beermann F. Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family. *Histol Histopathol.* 2006;2:567-578.

Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, et al. A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr.* 2005;135:2425–2430.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-3421.

Naysmith L, Waterston K, Ha T, Flanagan N, Bisset Y, Ray A, et al. Quantitative measures of the effect of the melanocortin 1 receptor on human pigmentary status. *J Invest Dermatol.*2004;122: 423-428.

Nazarko, Preventing and treating skin tears. *Nursing and Residential Care,* 2005, 7(12): 549-50.



Nixon A J, Choy V J, Parry A L, Pearson A J. Fiber growth initiation in hair follicles of goats treated with melatonin. J Exp Zool. 1993;**267**: 47-56.

Oriá RB, Ferreira FV, Santana EN, Fernandes MR, e Brito GAC. Study of age-related changes in human skin using histomorphometric and autofluorescence approaches. An Brás Dermatol, 2003, 78(4): 425-434.

Ortonne JP [homepage on the Internet]. Skin color variations in humankind: an explanation? Nice: Pigmentary Disorders Academy; 2005 [cited 2009 Jun 23]. Available from: [http://www.pigmentarydisordersacademy.org/guest\\_editorials\\_ortonne\\_skincolor.jsp](http://www.pigmentarydisordersacademy.org/guest_editorials_ortonne_skincolor.jsp).

Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez R, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden L, et al. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. J Pineal Res. 1995;19:111-115.

Park HJ, Lee YJ, Ryu HK, Kim MH, Chung HW, Kim WY. A randomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of *Spirulina* in elderly Koreans. Ann Nutr Metab. 2008;52:322-328.

Park JY, Kim WY. The effect of *Spirulina* on lipid metabolism, antioxidant capacity and immune function in Korean elderly. The Korean J Nutrition. 2003;36:287-297.

Patel A, Mishra S, Ghosh PK. Antioxidant potential of C-phycocyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. Indian J Biochem Biophys. 43:25-31; 2006.

Paterson RR. *Cordyceps*: A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? Phytochemistry. 69:1469-1495, 2008.

Paterson RR. *Ganoderma*— a therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry. 67:1985-2001, 2006.

Pena Ferreira MR<sup>1</sup>, Costa PC, Bahia FM. Efficacy of anti-wrinkle products in skin surface appearance: a comparative study using non-invasive methods. Skin Res Technol. 2010 Nov;16(4):444-449.

Rato AG, Pedrero JG, Martinez MA, del Rio B, Lazo PS, Ramos S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. FASEB J. 1999;13:857-868.

Rees JL. Genetics of hair and skin color. Annu Rev Genet. 2003;37:67-90

Rees JL. The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. Pigment Cell Res. 2000;13:135-140.

Reiter RJ, Tan DX, Leon J, Kilic U, Kilic E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. Exp Biol Med (Maywood) 230: 104-117, 2005.

Relethford JH. Hemispheric difference in human skin color. *Am J Phys Anthropol.* 1997;104:449-457.

Remirez D, Fernández V, Tapia G, González R, Videla LA. Influence of C-phycocyanin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress and Kupffer cell functioning. *Inflamm Res.* 51:351-356; 2002b.

Remirez D, Ledón N, González R. Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. *Mediators Inflamm.* 11:81-85; 2002a.

Riss J, Décordé K, Sutra T, Delage M, Baccou JC, Jouy N, Brune JP, Oréal H, Cristol JP, Rouanet JM. Phycobiliprotein C-phycocyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *J Agric Food Chem.* 55:7962-7967; 2007

Romay C, Armesto J, Remirez D, González R, Ledon N, García I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm Res.* 1998a;47:36-41.

Romay C, Delgado R, Remirez D, González R, Rojas A. Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor-alpha and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin. *Arzneimittelforschung.* 51:733-736; 2001.

Romay C, Ledón N, González R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res.* 1998b;47:334-338.

Romay Ch, González R, Ledón N, Remirez D, Rimbau V. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr Protein Pept Sci.* 4:207-216; 2003.

Rouzaud F, Costin GE, Yamaguchi Y, Valencia JC, Berens WF, Chen KG, et al. Regulation of constitutive and UVR-induced skin pigmentation by melanocortin 1 receptor isoforms. *Faseb J.* 2006; 20:1927-1999.

Rouzaud F, Hearing VJ. Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. *Peptides.* 2005;26:1858-1870.

Rouzaud F, Kadekaro AL, Abdel-Malek ZA, Hearing VJ. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res.* 2005;57:133-152.

Ryoo YW, Suh SI, Mun KC, Kim BC, Lee KS. The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2001;27:162-169.

Sapp J. The Prokaryote-Eukaryote Dichotomy: Meanings and Mythology. *Microbiol and Mol Biol Rev.* 2005;69:292-305.

Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE, Cueno KL, Martin SM, Buettner GR. Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biol Chem.* 2002;383: 671-681.

Schaffer JV, Bolognia JL. The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch Dermatol.* 2001;137: 1477-1485.

Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res.* 2002;15:433-439.

Scott MC, Wakamatsu K, Ito S, Kadokaro AL, Kobayashi N, Groden J, et al. Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. *J Cell Sci.* 2002;115:2349-5235.

Seiberg M. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer *Pigment Cell Res.* 2001 Aug;14(4):236-42)

Sharma RK, Singh VN, Reddy HK. Thinking beyond low-density lipoprotein cholesterol: strategies to further reduce cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5:793-799.

Shih CM, Cheng SN, Wong CS, Kuo YL, Chou TC. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin. *Anesth Analg.* 2009;108:1303-1310.

Shindo Y, Witt E, Han D, Packer L. Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol.* 1994;102: 470-475.

Simpore J, Zongo F, Kabore F, Dansou D, Bere A, Nikiema JB., and Musumeci, S (2005). Nutrition rehabilitation of HIV-infected and HIV-negative undernourished children utilizing spirulina. *Annals of nutrition and metabolism*, 49(6), 373-380.

Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, Slominski RM, Tobin DJ. (2005). "Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration". *Endocrine* 27: 137-148.

Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniowski A, et al. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J.* 2002;16:896-898.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiol Rev*;84: 1155-1228. 2004.

Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: Regulation of global homeostasis by the skin neuroendocrine regulation. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2012; 115, 212.

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997;272:20963-20966.

Storm CA, Elder DE. Pele. In: Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Swarting R, Strayer D. *Patologia: Bases clínico-patológicas da medicina.* vl. 1. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2006. p.1224-1291.

Sulaimon SS, Kitchell BE. The biology of melanocytes. *Vet Dermatol.* 2003;14: 57-65.

Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet.* 2007;39:1443-1452.

Sullivan R. *Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments.* 2002, 256p.

Tada A, Suzuki I, Im S et al. Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ.* 1998;9:575-584.

Tan CP, McKee KK, Weinberg DH, MacNeil T, Palyha OC, Feighner SD, et al. Molecular analysis of a new splice variant of the human melanocortin-1 receptor. *FEBS Lett.* 1999;451:137-141.

Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, et al. N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15:2294-2296; 2001.

Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2:181-197; 2002.

Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res.* 1998;1:265-274.

Thody AJ. alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;885:217-229.

Tie L, Yang HQ, An Y, Liu SQ, Han J, Xu Y, Hu M, Li WD, Chen AF, Lin ZB, Li XJ. *Ganoderma lucidum* polysaccharide accelerates refractory wound healing by inhibition of mitochondrial oxidative stress in type 1 diabetes. *Cell Physiol Biochem.* 29(3-4):583-594.

Torres-Duran PV, Paredes-Carbajal AMC, Mascher BD, Zamora-González BJ, Diáz-Zagoya CJD, Juárez-Oropeza AA. Protective Effect of *Arthrospira maxima* on Fatty Acid Composition in Fatty Liver. *Archives of Medical Research.* 2006;37:479-483.

Torres-Durán PV, Ferreira-Hermosillo A, Ramos-Jiménez A, Hernández-Torres R. P, Juárez-Oropeza, MA. (2012). Effect of *Spirulina maxima* on Postprandial Lipemia in Young Runners: A Preliminary Report. Journal of Medicinal Food, 15(8), 753-757.

Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte Function and Its Control by Melanocortin Peptides. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 50(2): 125-133. 2002.

Vonshak A, editor. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis; 1997.

Wagner JK, Parra EJ, LNorton H, Jovel C, Shriver MD. Skin responses to ultraviolet radiation: effects of constitutive pigmentation, sex, and ancestry. Pigment Cell Re. 2002;15:385-390.

Wang H, "Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*". Peptides 2006; 27 (1): 27-30.

Wang J, Wang Y, Liu X, Yuan Y, Yue T. Free radical scavenging and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides derivatives. Carbohydr Polym. 2;91(1):33-38. 2013.

Wang JZ, Wang ZF. "On the Role of Melatonin in Skin Physiology and Pathology". Acta Pharmacol Sinica, **27**: 41-49; 2006.

Welch RAS, Gurnsey MP, Betteridge K, Mitchell RJ. Proc N Z Soc Anim Prod. 1990;50:335-338.

Wickelgren I. Skin biology. A healthy tan? Science. 2007; 315:1214-6.

Wolf R, Wolf D, Tamir A, Politi Y. Melasma: a mask of stress. Br J Dermatol. 1991; 125: 192-193.

Xiao C, Wu QP, Cai W, Tan JB, Yang XB, Zhang. Hypoglycemic effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in type 2 diabetic mice. JM.Arch Pharm Res. 35(10):1793-801. 2012.

Yi Y, Hu S, Xiong X, Liu D, Zhong Y. Wei Sheng Yan Jiu. Study the rudimentary immunoregulatory mechanisms of *Ganoderma* Spore oil on immunocompromized mice]. 2012 Sep;41(5):833-9.

Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Reactive oxygen species in vascular wall. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2006;6:1-19.

Zhou X, Lin J, Yin Y, Zhao J, Sun X, Tang K. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. Am J Chin Med. 35(4):559-574. 2007.

## REFERÊNCIAS INTERNET

Who, 2013A

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78102/1/WHO\\_HSE\\_PHE\\_IHE\\_2013.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78102/1/WHO_HSE_PHE_IHE_2013.1_eng.pdf)

[http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone\\_disrupting\\_2013\\_0219/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone_disrupting_2013_0219/en/index.html)

<http://www.eea.europa.eu/pressroom/newsreleases/increase-in-cancers-and-fertility>

<http://www.eea.europa.eu/publications/the-impacts-of-endocrine-disrupters>

[http://ec.europa.eu/environment/endocrine/strategy/substances\\_en.htm#priority\\_list](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/strategy/substances_en.htm#priority_list)

<http://www.beyondpesticides.org/dailynewsblog/?p=5294>

<http://www.ewg.org/>

<http://www.ewg.org/research/down-drain/what-you-can-do>

<http://www.ourstolenfuture.org/Basics/chemlist.htm>

<http://www.ourstolenfuture.org/basics/chemuses.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3404651/>

[http://www.huffingtonpost.com/2012/03/28/bisphenol-a-endocrine-disruptors\\_n\\_1385945.html#slide=821955](http://www.huffingtonpost.com/2012/03/28/bisphenol-a-endocrine-disruptors_n_1385945.html#slide=821955)

## APÊNDICES

### Apêndice 1: Análise da Classificação Fitzpatrick

Cálculos realizados no programa Assistat  
 Poros pequenos I e II  
 =====  
 ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>  
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/03/2014  
 =====  
 Arquivo temporário Data 18/03/2014 Hora 15:29:23

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	15487.10905	3871.77726	9.9934 **
Resíduo	34	13172.77568	387.43458	
Total	38	28659.88473		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	9.9934	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	57.55262 a	nr =	8
2	34.47157 ab	nr =	7
3	23.65162 b	nr =	8
4	58.21436 a	nr =	11
5	2.50986 b	nr =	5

dms = 56.74547 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 39.58570

CV% = 49.72

Ponto médio = 48.09905

#### Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95049	0.08539	Sim

Poros Grande

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>  
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/03/2014

=====

Arquivo temporário Data 20/03/2014 Hora 14:39:08

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
 QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	16132.49661	4033.12415	8.4104 **
Resíduo	34	16304.30856	479.53849	
Total	38	32436.80517		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	8.4104	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	69.37612 a	nr =	8
2	38.86457 a	nr =	7
3	49.19962 a	nr =	8
4	58.21382 a	nr =	11
5	1.66660 b	nr =	5

dms = 63.13115 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 47.93187

CV% = 45.69

Ponto médio = 47.28250

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09232	0.14048	$p > .15$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.10775	0.12441	$p > .05$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.73555	0.72459	$p < .05$	Não
Kuiper (V)	0.18416	0.23170	$p > .15$	Sim
Watson (U2)	0.10206	0.11453	$p > .05$	Sim
Lilliefors (D)	0.09184	0.14187	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93630	-	0.02875	Não

=====

ASSISTAT Versão 7.7 beta (2014) - Homepage <http://www.assistat.com>  
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/03/2014

=====

Arquivo temporário Data 20/03/2014 Hora 15:05:42



## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	23174.07372	5793.51843	17.6903 **
Resíduo	47	15392.36187	327.49706	
Total	51	38566.43559		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	47	3.7482	17.6903	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	58.27707 a	nr =	14
2	37.51175 a	nr =	8
3	39.61773 a	nr =	11
4	61.81280 a	nr =	10
5	0.74622 b	nr =	9

dms =  $51.35451 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 41.85792

CV% = 43.23

Ponto médio = 45.41250

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.08987	0.12228	$p > .15$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.06138	0.12480	$p > .15$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.57914	0.73711	$p > .10$	Sim
Kuiper (V)	0.16533	0.20190	$p > .15$	Sim
Watson (U2)	0.06085	0.11490	$p > .15$	Sim
Lilliefors (D)	0.08987	0.12287	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94997	-	0.02904	Não

Rugas VR

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	16182.01014	4045.50254	5.2689 **
Resíduo	34	26105.69201	767.81447	
Total	38	42287.70215		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	5.2689	0.0021

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	63.22825 a	nr =	8
2	63.52457 a	nr =	7
3	64.15437 a	nr =	8
4	44.49864 ab	nr =	11
5	1.89560 b	nr =	5

dms =  $79.88406 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 50.32554

CV% = 55.06

Ponto médio = 24.18750

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09425	0.14048	$p > .15$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.05920	0.12441	$p > .15$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.46015	0.72459	$p > .15$	Sim
Kuiper (V)	0.17283	0.23170	$p > .15$	Sim
Watson (U2)	0.04564	0.11453	$p > .15$	Sim
Lilliefors (D)	0.07859	0.14187	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94743	-	0.06736	Sim

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	21442.51187	5360.62797	5.5513 **
Resíduo	47	45385.59464	965.65095	
Total	51	66828.10651		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )  
 ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	47	3.7482	5.5513	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	53.05707 a	nr = 14
2	64.22237 a	nr = 8
3	52.65264 a	nr = 11
4	44.77720 a	nr = 10
5	1.58044 b	nr = 9

dms = 88.18303 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 44.18756

CV% = 70.33

Ponto médio = 1.29500

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12366	0.12228	$p < .05$	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.10502	0.12480	$p > .05$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.82959	0.73711	$p < .05$	Não
Kuiper (V)	0.21053	0.20190	$p < .05$	Não
Watson (U2)	0.09422	0.11490	$p > .10$	Sim
Lilliefors (D)	0.10443	0.12287	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.91653	-	0.00140	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	19449.77386	4862.44346	11.4060 **
Resíduo	39	16625.98321	426.30726	
Total	43	36075.75707		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )  
 ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	11.406	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	57.34267 a	nr = 9
2	64.33769 a	nr = 13
3	57.39950 a	nr = 10
4	37.88917 a	nr = 6
5	0.14817 b	nr = 6

dms = 59.06173 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 48.97030

CV% = 42.16

Ponto médio = 45.12600

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.10883	0.13257	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.10091	0.12458	p > .10	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.68958	0.73006	p > .05	Sim
Kuiper (V)	0.18734	0.21875	p > .15	Sim
Watson (U2)	0.09611	0.11470	p > .05	Sim
Lilliefors (D)	0.08611	0.13357	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94172	-	0.02729	Não

### Rugas Àreas

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	9335.63988	2333.90997	8.8302 **
Resíduo	34	8986.54102	264.31003	
Total	38	18322.18089		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	8.8302	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	55.62888 a	nr = 8
2	28.35271 bc	nr = 7
3	32.86950 ab	nr = 8
4	43.66173 ab	nr = 11
5	4.00000 c	nr = 5

dms = 46.86934 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 36.07013

CV% = 45.07

Ponto médio = 49.65300

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.96491	0.25887	Sim

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	14888.94616	3722.23654	18.8546 **
Resíduo	47	9278.61986	197.41744	
Total	51	24167.56603		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	47	3.7482	18.8546	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	46.34014 ab	nr = 14
2	47.48537 a	nr = 8
3	30.22127 a c	nr = 11
4	43.36930 abc	nr = 10
5	0.19833 d	nr = 9

dms = 39.87197 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 34.54917

CV% = 40.67

Ponto médio = 33.75000

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12180	0.12228	$p > .05$	Sim

Cramér-von Mises (W2)	0.10204	0.12480	p > .10	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.78153	0.73711	p < .05	Não
Kuiper (V)	0.23863	0.20190	p < .01	Não
Watson (U2)	0.09521	0.11490	p > .05	Sim
Lilliefors (D)	0.11683	0.12287	p > .05	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.95861	-	0.06810	Sim

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	6224.64371	1556.16093	5.9688 **
Resíduo	39	10167.93342	260.71624	
Total	43	16392.57713		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	5.9688	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS  
Médias de tratamento

1	39.52289 a	nr = 9
2	33.75046 a	nr = 13
3	36.09330 a	nr = 10
4	42.96100 a	nr = 6
5	3.70367 b	nr = 6

dms = 46.18797 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 32.62234

CV% = 49.50

Ponto médio = 38.63600

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.96985	0.29893	Sim

Rugas Profundidade

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	13982.30088	3495.57522	4.8067 **
Resíduo	34	24725.86700	727.23138	

Total 38 38708.16788

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	4.8067	0.0035

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	69.64713 a	nr =	8
2	46.18643 ab	nr =	7
3	56.07438 a	nr =	8
4	55.88791 a	nr =	11
5	5.00000 b	nr =	5

dms = 77.74425 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 50.48318

CV% = 53.42

Ponto médio = 49.77750

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09699	0.14048	$p > .15$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.07097	0.12441	$p > .15$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.65062	0.72459	$p > .05$	Sim
Kuiper (V)	0.18969	0.23170	$p > .15$	Sim
Watson (U2)	0.06926	0.11453	$p > .15$	Sim
Lilliefors (D)	0.09699	0.14187	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93287	-	0.02224	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	29406.35171	7351.58793	11.6529 **
Resíduo	47	29651.34706	630.87972	
Total	51	59057.69877		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
----	-----	--------	---	---

4                      47                      3.7482                      11.6529                      <0.001

# MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	71.94914	a	nr =	14
2	49.76100	ab	nr =	8
3	39.81500	b	nr =	11
4	35.35290	b	nr =	10
5	0.00000	c	nr =	9

dms = 71.27680 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 42.24750

CV% = 59.45

Ponto médio = 48.00000

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.14279	0.12228	p < .01	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.19358	0.12480	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	1.55423	0.73711	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.25000	0.20190	p < .01	Não
Watson (U2)	0.19266	0.11490	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.14279	0.12287	p < .05	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.89635	-	0.00028	Não

ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

<http://www.assistat.com>

Data: 21/03/2014 Hora: 09:17:53

Hipótese nula (H0):

Os tratamentos não são diferentes

Ao nível de 5% de probabilidade

H = 26.5179 Hkrit = 9.4877

p-valor < 0.05 H0 foi rejeitada

Ao nível de 1% de probabilidade

H = 26.5179 Hkrit = 13.2767

p-valor < 0.01 H0 foi rejeitada

## Comparação dos tratamentos - Teste de Mann-Whitney

Trat1 x Trat2	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat1 x Trat3	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat1 x Trat4	p-valor < 0.05	São diferentes



Trat1 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat2 x Trat3	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat2 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat2 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat3 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat3 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat4 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
-----		
Trat1 x Trat2	p-valor = 0.10	Não são diferentes
Trat1 x Trat3	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat1 x Trat4	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat1 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat2 x Trat3	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat2 x Trat4	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat2 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat3 x Trat4	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat3 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat4 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
-----		

## OBSERVAÇÃO

Este programa faz a correção de H  
para dados iguais nos tratamentos

## MÉDIAS

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos
1	14	71.94914	553.000
2	8	49.76100	244.000
3	11	39.81500	277.500
4	10	35.35290	240.500
5	9	0.00000	63.000

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	17391.24292	4347.81073	6.5213 **
Resíduo	39	26001.55185	666.70646	
Total	43	43392.79478		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	6.5213	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	65.00822 a	nr = 9
2	38.51308 ab	nr = 13
3	55.70720 a	nr = 10
4	39.72917 ab	nr = 6
5	0.00000 b	nr = 6

```

-----
dms =      73.86048 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)
Onde nr1 e nr2 são os números de
repetições de duas médias comparadas
nr = número de repetições do tratamento

```

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 42.75434

CV% = 60.39

Ponto médio = 46.88100

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.13534	0.13257	p < .05	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.15127	0.12458	p < .025	Não
Anderson-Darling (A2)	1.03228	0.73006	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.24054	0.21875	p < .025	Não
Watson (U2)	0.15126	0.11470	p < .025	Não
Lilliefors (D)	0.13534	0.13357	p < .05	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.92195	-	0.00553	Não

Por Kruskal

```

=====
ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS
http://www.assistat.com
=====
Data: 21/03/2014  Hora: 09:15:52

```

Hipótese nula (H0):  
Os tratamentos não são diferentes

Ao nível de 5% de probabilidade  
H = 17.5318 Hkrit = 9.4877  
p-valor < 0.05 H0 foi rejeitada

Ao nível de 1% de probabilidade  
H = 17.5318 Hkrit = 13.2767  
p-valor < 0.01 H0 foi rejeitada

Comparação dos tratamentos - Teste de Mann-Whitney

Trat1 x Trat2	p-valor = 0.05	Não são diferentes
Trat1 x Trat3	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat1 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat1 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat2 x Trat3	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat2 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat2 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat3 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat3 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat4 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat1 x Trat2	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat1 x Trat3	p-valor > 0.10	Não são diferentes

Trat1 x Trat4	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat1 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat2 x Trat3	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat2 x Trat4	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat2 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat3 x Trat4	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat3 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat4 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes

## OBSERVAÇÃO

Este programa faz a correção de H  
para dados iguais nos tratamentos

## MÉDIAS

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos
1	9	65.00822	282.500
2	13	38.51308	278.500
3	10	55.70720	278.000
4	6	39.72917	121.000
5	6	0.00000	30.000

%Àrea Rugas

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	14012.09402	3503.02350	9.4731 **
Resíduo	34	12572.76087	369.78708	
Total	38	26584.85489		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	9.4731	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	62.04375 a	nr =	8
2	37.91257 a	nr =	7
3	58.24937 a	nr =	8
4	44.79509 a	nr =	11
5	0.37020 b	nr =	5

dms = 55.43804 x RaizQuardr(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 44.16231

CV% = 43.54

Ponto médio = 45.97700

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.11333	0.14048	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.10832	0.12441	p > .05	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.73868	0.72459	p < .05	Não
Kuiper (V)	0.21235	0.23170	p > .10	Sim
Watson (U2)	0.10139	0.11453	p > .05	Sim
Lilliefors (D)	0.09902	0.14187	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94123	-	0.04181	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	19852.01102	4963.00276	15.7811 **
Resíduo	47	14781.04354	314.49029	
Total	51	34633.05456		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p &lt; .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =&lt; p &lt; .05)

ns não significativo (p &gt;= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	47	3.7482	15.7811	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	53.12336 a	nr = 14
2	48.80225 a	nr = 8
3	37.81927 a	nr = 11
4	55.42800 a	nr = 10
5	0.00000 b	nr = 9

dms = 50.32439 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 40.46994

CV% = 43.82

Ponto médio = 44.89750

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.11287	0.12228	p > .05	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.08804	0.12480	p > .15	Sim

Anderson-Darling (A2)	0.74521	0.73711	p < .05	Não
Kuiper (V)	0.18107	0.20190	p > .10	Sim
Watson (U2)	0.08511	0.11490	p > .10	Sim
Lilliefors (D)	0.11287	0.12287	p > .05	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94648	-	0.02071	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	11636.42017	2909.10504	12.0233 **
Resíduo	39	9436.25174	241.95517	
Total	43	21072.67191		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	12.0233	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	52.68089 a	nr =	9
2	43.80346 a	nr =	13
3	38.00250 a	nr =	10
4	46.52000 a	nr =	6
5	-0,3875 b	nr =	6

dms = 44.49511 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 38.64530

CV% = 40.25

Ponto médio = 40.62850

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.11407	0.13257	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.14804	0.12458	p < .025	Não
Anderson-Darling (A2)	1.02098	0.73006	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.22579	0.21875	p < .05	Não
Watson (U2)	0.13729	0.11470	p < .025	Não
Lilliefors (D)	0.11172	0.13357	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93588	-	0.01682	Não

## Apêndice 2: Tabela de Redução por Idade

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	11947.94316	2986.98579	10.9523 **
Resíduo	34	9272.70251	272.72654	
Total	38	21220.64567		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	10.9523	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS  
Médias de tratamento

1	58.19138 a	nr = 8
2	25.12156 bc	nr = 9
3	27.65612 bc	nr = 8
4	45.92878 ab	nr = 9
5	2.50940 c	nr = 5

dms = 47.60973 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 34.32769

CV% = 48.11

Ponto médio = 48.09850

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95998	0.17811	Sim

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	14609.12903	3652.28226	20.3553 **
Resíduo	39	6997.65193	179.42697	
Total	43	21606.78097		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	20.3553	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	58.49250 a	nr = 10
2	40.92800 b	nr = 10
3	35.49225 b	nr = 8
4	46.49689 ab	nr = 9
5	0.87971 c	nr = 7

dms = 38.31675 x RaizQuadr(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 38.69939

CV% = 34.61

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12764	0.13257	p > .05	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.15164	0.12458	p < .025	Não
Anderson-Darling (A2)	0.95990	0.73006	p < .025	Não
Kuiper (V)	0.22186	0.21875	p < .05	Não
Watson (U2)	0.14468	0.11470	p < .025	Não
Lilliefors (D)	0.10491	0.13357	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93827	-	0.02047	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	12516.50852	3129.12713	11.3248 **
Resíduo	42	11604.92717	276.30779	
Total	46	24121.43568		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	42	3.8027	11.3248	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	50.99692 a	nr = 13
2	29.94514 a	nr = 7
3	36.76708 a	nr = 13
4	50.80888 a	nr = 8
5	0.25050 b	nr = 6

dms = 47.38496 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.41536

CV% = 44.43

Ponto médio = 43.19700

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.96925	0.24813	Sim

Poros Grandes

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	10057.27396	2514.31849	4.5112 **
Resíduo	34	18949.71129	557.34445	
Total	38	29006.98526		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	4.5112	0.005

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	53.37375 a	nr = 8
2	30.73889 ab	nr = 9
3	39.53050 ab	nr = 8
4	48.94011 a	nr = 9
5	1.66660 b	nr = 5

dms = 68.06029 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento



As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.65841

CV% = 62.69

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.13399	0.14048	p > .05	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.17913	0.12441	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	1.09567	0.72459	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.25485	0.23170	p < .025	Não
Watson (U2)	0.17912	0.11453	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.12086	0.14187	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.91892	-	0.00806	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	17585.64868	4396.41217	11.1694 **
Resíduo	39	15350.87702	393.61223	
Total	43	32936.52570		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	11.1694	<0.001

##### MÉDIAS E MEDIDAS

###### Médias de tratamento

1	60.01860 a	nr = 10
2	42.42770 a	nr = 10
3	50.81337 a	nr = 8
4	65.85934 a	nr = 9
5	4.96871 b	nr = 7

dms = 56.75173 x RaizQuadr(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 46.78375

CV% = 42.41

Ponto médio = 47.28250

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.08113	0.13257	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.07717	0.12458	p > .15	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.59973	0.73006	p > .10	Sim
Kuiper (V)	0.15972	0.21875	p > .15	Sim
Watson (U2)	0.07158	0.11470	p > .15	Sim
Lilliefors (D)	0.08113	0.13357	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94845	-	0.04822	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	20992.64229	5248.16057	16.3474 **
Resíduo	42	13483.69102	321.04026	
Total	46	34476.33331		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	42	3.8027	16.3474	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	63.36885 ab	nr =	13
2	47.22914 ab	nr =	7
3	44.41977 b	nr =	13
4	72.08075 a	nr =	8
5	1.11933 c	nr =	6

$dms = 51.07680 \times \text{RaizQuadrd}(1/nr1 + 1/nr2)$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 49.25996

CV% = 36.37

Ponto médio = 46.64400

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.10169	0.12841	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.09640	0.12467	p > .10	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.69624	0.73292	p > .05	Sim
Kuiper (V)	0.18317	0.21195	p > .15	Sim
Watson (U2)	0.08574	0.11478	p > .10	Sim
Lilliefors (D)	0.08148	0.12924	p > .15	Sim

Shapiro-Wilk (W) 0.94490 - 0.02743 Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	7742.50622	1935.62655	7.7262 **
Resíduo	34	8517.93919	250.52762	
Total	38	16260.44541		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	7.7262	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	41.99600 a	nr =	8
2	45.94267 a	nr =	9
3	28.57962 ab	nr =	8
4	44.57222 a	nr =	9
5	2.93660 b	nr =	5

dms = 45.63098 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 35.74159

CV% = 44.28

Ponto médio = 37.50000

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.96523	0.26527	Sim

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	10692.89464	2673.22366	12.7763 **
Resíduo	39	8160.07676	209.23274	
Total	43	18852.97140		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	12.7763	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	45.59480 a	nr = 10
2	39.92140 a	nr = 10
3	46.94325 a	nr = 8
4	46.09133 a	nr = 9
5	2.43900 b	nr = 7

dms =  $41.37706 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$   
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.78643

CV% = 38.28

Ponto médio = 39.09050

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95465	0.08204	Sim

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	10759.01864	2689.75466	5.7125 **
Resíduo	42	19776.00029	470.85715	
Total	46	30535.01893		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	42	3.8027	5.7125	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	48.48384 a	nr = 13
2	40.19857 a	nr = 7
3	31.44692 a	nr = 13
4	46.48312 a	nr = 8
5	0.73567 b	nr = 6

dms =  $61.85695 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$   
 Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 36.10147

CV% = 60.11

Ponto médio = 43.54800

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09872	0.12841	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.08170	0.12467	p > .15	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.63666	0.73292	p > .05	Sim
Kuiper (V)	0.17930	0.21195	p > .15	Sim
Watson (U2)	0.08085	0.11478	p > .15	Sim
Lilliefors (D)	0.09872	0.12924	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94664	-	0.03202	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	32330.47491	8082.61873	11.8795 **
Resíduo	34	23133.06855	680.38437	
Total	38	55463.54347		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	11.8795	<0.001

##### MÉDIAS E MEDIDAS

###### Médias de tratamento

1	63.35000 a	nr =	8
2	86.36911 a	nr =	9
3	17.74862 b	nr =	8
4	55.36289 a	nr =	9
5	4.34780 b	nr =	5

dms = 75.19849 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 49.90041

CV% = 52.27

Ponto médio = 82.40700  
 NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.10180	0.14048	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.06556	0.12441	p > .15	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.55375	0.72459	p > .10	Sim
Kuiper (V)	0.19756	0.23170	p > .15	Sim
Watson (U2)	0.05605	0.11453	p > .15	Sim
Lilliefors (D)	0.10180	0.14187	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93530	-	0.02667	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	19780.11950	4945.02987	15.9014 **
Resíduo	39	12128.23663	310.98043	
Total	43	31908.35613		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	15.9014	<0.001

##### MÉDIAS E MEDIDAS

###### Médias de tratamento

1	58.02450 a	nr = 10
2	49.92270 ab	nr = 10
3	28.72613 b	nr = 8
4	59.72333 a	nr = 9
5	0.00000 c	nr = 7

dms = 50.44421 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 41.97252

CV% = 42.01

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.10783	0.13257	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.09408	0.12458	p > .10	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.79663	0.73006	p < .05	Não

Kuiper (V)	0.20067	0.21875	p > .10	Sim
Watson (U2)	0.09109	0.11470	p > .10	Sim
Lilliefors (D)	0.10783	0.13357	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93672	-	0.01802	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	18697.68477	4674.42119	9.0444 **
Resíduo	42	21706.77524	516.82798	
Total	46	40404.46000		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	42	3.8027	9.0444	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	63.28362 a	nr = 13
2	31.17957 bc	nr = 7
3	41.59377 ab	nr = 13
4	56.29250 ab	nr = 8
5	0.30850 c	nr = 6

dms = 64.80626 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 43.27349

CV% = 52.54

Ponto médio = 47.75000

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.11322	0.12841	p > .10	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.07192	0.12467	p > .15	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.61300	0.73292	p > .05	Sim
Kuiper (V)	0.18536	0.21195	p > .15	Sim
Watson (U2)	0.07189	0.11478	p > .15	Sim
Lilliefors (D)	0.11322	0.12924	p > .10	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94498	-	0.02762	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	11441.50487	2860.37622	4.4281 **
Resíduo	34	21962.79218	645.96448	
Total	38	33404.29705		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	4.4281	0.0055

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	57.91000 a	nr =	8
2	64.79134 a	nr =	9
3	41.58725 ab	nr =	8
4	45.62133 ab	nr =	9
5	8.55780 b	nr =	5

dms =  $73.27170 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 46.98669

CV% = 54.09

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12727	0.14048	$p > .10$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.12209	0.12441	$p > .05$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.71577	0.72459	$p > .05$	Sim
Kuiper (V)	0.24171	0.23170	$p < .05$	Não
Watson (U2)	0.11961	0.11453	$p < .05$	Não
Lilliefors (D)	0.12727	0.14187	$p > .10$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94192	-	0.04406	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	21495.55724	5373.88931	10.9729 **
Resíduo	39	19099.90317	489.74111	
Total	43	40595.46041		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )



ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	10.9729	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	58.61520 a	nr = 10
2	54.76820 ab	nr = 10
3	67.12425 a	nr = 8
4	29.16533 bc	nr = 9
5	2.68686 c	nr = 7

dms =  $63.30355 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$   
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 44.36645

CV% = 49.88

Ponto médio = 47.79300

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12315	0.13257	$p > .05$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.13007	0.12458	$p < .05$	Não
Anderson-Darling (A2)	0.86105	0.73006	$p < .025$	Não
Kuiper (V)	0.20945	0.21875	$p > .05$	Sim
Watson (U2)	0.12912	0.11470	$p < .05$	Não
Lilliefors (D)	0.10043	0.13357	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93203	-	0.01230	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	19764.17367	4941.04342	8.5416 **
Resíduo	42	24295.65034	578.46787	
Total	46	44059.82400		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	42	3.8027	8.5416	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	67.30308 a	nr = 13
2	60.91086 a	nr = 7
3	49.24084 a	nr = 13
4	37.12587 ab	nr = 8
5	1.83300 b	nr = 6

dms = 68.56201 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 47.86068

CV% = 50.25

Ponto médio = 48.33100

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.10163	0.12841	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.09112	0.12467	p > .10	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.73402	0.73292	p < .05	Não
Kuiper (V)	0.18411	0.21195	p > .15	Sim
Watson (U2)	0.08967	0.11478	p > .10	Sim
Lilliefors (D)	0.10163	0.12924	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93771	-	0.01460	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	14725.37727	3681.34432	7.0783 **
Resíduo	34	17683.07163	520.09034	
Total	38	32408.44890		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	7.0783	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	62.87513 a	nr = 8
2	60.30178 a	nr = 9
3	33.36312 ab	nr = 8
4	37.39745 ab	nr = 9
5	3.38020 b	nr = 5

dms = 65.74631 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 42.72051

CV% = 53.38

Ponto médio = 48.98500

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.13788	0.14048	p > .05	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.09747	0.12441	p > .10	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.67418	0.72459	p > .05	Sim
Kuiper (V)	0.23615	0.23170	p < .05	Não
Watson (U2)	0.09408	0.11453	p > .10	Sim
Lilliefors (D)	0.13788	0.14187	p > .05	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94078	-	0.04038	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	22745.64074	5686.41019	12.1732 **
Resíduo	39	18217.92008	467.12616	
Total	43	40963.56082		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	12.1732	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	62.27030 ab	nr = 10
2	73.29540 a	nr = 10
3	56.76975 ab	nr = 8
4	41.88556 b	nr = 9
5	3.92757 c	nr = 7

dms = 61.82468 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 50.32450

CV% = 42.95

Ponto médio = 46.71450

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12305	0.13257	p > .05	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.17027	0.12458	p < .025	Não
Anderson-Darling (A2)	1.04559	0.73006	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.23640	0.21875	p < .025	Não
Watson (U2)	0.16846	0.11470	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.11335	0.13357	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.92134	-	0.00528	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	16186.53200	4046.63300	8.4635 **
Resíduo	42	20081.41718	478.12898	
Total	46	36267.94918		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p &lt; .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =&lt; p &lt; .05)

ns não significativo (p &gt;= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	42	3.8027	8.4635	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	70.75946 a	nr = 13
2	57.33871 a	nr = 7
3	53.57377 a	nr = 13
4	51.22913 a	nr = 8
5	8.41150 b	nr = 6

dms = 62.33278 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 52.72351

CV% = 41.47

Ponto médio = 46.34550

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.08159	0.12841	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.05244	0.12467	p > .15	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.56361	0.73292	p > .10	Sim
Kuiper (V)	0.14630	0.21195	p > .15	Sim

Watson (U2)	0.04602	0.11478	p > .15	Sim
Lilliefors (D)	0.08159	0.12924	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94292	-	0.02303	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	6078.00339	1519.50085	6.8602 **
Resíduo	34	7530.88521	221.49662	
Total	38	13608.88861		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	6.8602	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	41.78288 a	nr =	8
2	39.93967 a	nr =	9
3	22.60712 ab	nr =	8
4	35.96967 a	nr =	9
5	4.00000 b	nr =	5

dms = 42.90575 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 31.23856

CV% = 47.64

Ponto médio = 32.50000

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95765	0.14876	Sim

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	10918.62693	2729.65673	7.5379 **
Resíduo	39	14122.92163	362.12620	
Total	43	25041.54856		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )  
 ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	7.5379	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	49.96090 a	nr = 10
2	33.51220 a	nr = 10
3	45.08237 a	nr = 8
4	46.43578 a	nr = 9
5	3.62800 b	nr = 7

dms = 54.43457 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.24336

CV% = 51.10

Ponto médio = 49.65300

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.97142	0.33928	Sim

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	9838.40074	2459.60018	13.9921 **
Resíduo	42	7382.96623	175.78491	
Total	46	17221.36696		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )  
 ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	42	3.8027	13.9921	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	47.35592 a	nr = 13
2	39.70528 ab	nr = 7
3	28.03515 b	nr = 13
4	48.65387 a	nr = 8
5	4.46417 c	nr = 6

dms = 37.79503 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 35.61781

CV% = 37.22

Ponto médio = 40.00000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.97582	0.43252	Sim

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	20013.74562	5003.43641	7.3521 **
Resíduo	34	23138.68024	680.54942	
Total	38	43152.42586		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	7.3521	<0.001

##### MÉDIAS E MEDIDAS

###### Médias de tratamento

1	74.82262 a	nr = 8
2	52.55867 ab	nr = 9
3	29.87638 bc	nr = 8
4	52.02555 ab	nr = 9
5	0.00000 c	nr = 5

dms = 75.20761 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 45.61154

CV% = 57.19

Ponto médio = 46.42850

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
---------------------	-------	-------	---------	--------

Kolmogorov-Smirnov (D)	0.13859	0.14048	p > .05	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.16141	0.12441	p < .025	Não
Anderson-Darling (A2)	1.25455	0.72459	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.25577	0.23170	p < .025	Não
Watson (U2)	0.16115	0.11453	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.11718	0.14187	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.89160	-	0.00128	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	17097.98606	4274.49652	6.0602 **
Resíduo	39	27508.40009	705.34359	
Total	43	44606.38615		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	6.0602	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	67.39750 a	nr = 10
2	36.47200 ab	nr = 10
3	47.94638 a	nr = 8
4	40.61389 ab	nr = 9
5	4.08157 b	nr = 7

dms = 75.97053 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 41.28095

CV% = 64.34

Ponto médio = 49.77750

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	18818.20416	4704.55104	6.0216 **
Resíduo	42	32813.92010	781.28381	
Total	46	51632.12426		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)



ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	42	3.8027	6.0216	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	67.46023 a	nr = 13
2	46.11543 a	nr = 7
3	45.25754 a	nr = 13
4	41.44513 ab	nr = 8
5	0.00000 b	nr = 6

dms = 79.67982 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 45.10000

CV% = 61.98

Ponto médio = 48.00000

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12365	0.12841	$p > .05$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.12838	0.12467	$p < .05$	Não
Anderson-Darling (A2)	1.07322	0.73292	$p < .01$	Não
Kuiper (V)	0.21277	0.21195	$p < .05$	Não
Watson (U2)	0.12836	0.11478	$p < .05$	Não
Lilliefors (D)	0.12365	0.12924	$p > .05$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.91278	-	0.00189	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	15024.04209	3756.01052	14.1468 **
Resíduo	34	9027.11428	265.50336	
Total	38	24051.15637		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	34	3.9287	14.1468	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	65.10675 a	nr =	8
2	46.46900 ab	nr =	9
3	30.77100 b	nr =	8
4	51.10133 ab	nr =	9
5	0.00000 c	nr =	5

dms = 46.97502 x RaizQuadr(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 42.18346

CV% = 38.63

Ponto médio = 41.79100

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.94966	0.08004	Sim

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	14010.94154	3502.73539	9.9957 **
Resíduo	39	13666.60446	350.42576	
Total	43	27677.54601		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	39	3.8429	9.9957	<0.001

##### MÉDIAS E MEDIDAS

###### Médias de tratamento

1	56.38510 a	nr =	10
2	40.72890 a	nr =	10
3	36.65875 a	nr =	8
4	47.20133 a	nr =	9
5	0.60171 b	nr =	7

dms = 53.54794 x RaizQuadr(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 38.48714

CV% = 48.64

Ponto médio = 45.97700

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95096	0.05974	Sim

CLASSIFICAÇÃO GLOCAU  
EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	18020.46437	4505.11609	16.7190 **
Resíduo	56	15089.85310	269.46166	
Total	60	33110.31747		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	56	3.6746	16.719	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	55.50793 a	nr = 14
2	37.52423 b	nr = 13
3	33.25479 b	nr = 14
4	45.53890 ab	nr = 10
5	1.87050 c	nr = 10

dms = 46.29679 x RaizQuadr(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 36.14077

CV% = 45.42

Ponto médio = 48.09850

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.96280	0.06087	Sim

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	15165.97134	3791.49284	17.4058 **
Resíduo	48	10455.82887	217.82977	
Total	52	25621.80021		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	3.7387	17.4058	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	58.36558 a	nr = 12
2	28.19127 b	nr = 11
3	39.53950 b	nr = 12
4	44.04242 ab	nr = 12
5	0.00000 c	nr = 6

dms = 41.84928 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.99008

CV% = 38.85

Ponto médio = 40.54700

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.13180	0.12116	p < .025	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.13487	0.12482	p < .05	Não
Anderson-Darling (A2)	0.91275	0.73788	p < .025	Não
Kuiper (V)	0.22521	0.20006	p < .025	Não
Watson (U2)	0.13018	0.11492	p < .05	Não
Lilliefors (D)	0.11293	0.12170	p > .05	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94651	-	0.01911	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	8961.84001	2240.46000	13.0896 **
Resíduo	19	3252.09296	171.16279	
Total	23	12213.93297		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	4.5003	13.0896	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	54.22029 a	nr = 7
2	34.38500 ab	nr = 4
3	28.50500 b	nr = 4
4	52.53660 ab	nr = 5
5	0.37575 c	nr = 4

-----  
dms = 39.40935 x RaizQuadrado(1/nr1 + 1/nr2)  
Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.30367

CV% = 35.07

Ponto médio = 34.37500

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.20007	0.17679	p < .025	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.16751	0.12343	p < .025	Não
Anderson-Darling (A2)	1.03255	0.70064	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.32662	0.29103	p < .025	Não
Watson (U2)	0.15654	0.11363	p < .025	Não
Lilliefors (D)	0.15840	0.17600	p > .10	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.88382	-	0.00993	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	20695.26049	5173.81512	12.9067 **
Resíduo	56	22448.31519	400.86277	
Total	60	43143.57568		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 <= p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	56	3.6746	12.9067	<0.001

##### MÉDIAS E MEDIDAS

###### Médias de tratamento

1	60.54478 a	nr = 14
2	35.33538 b	nr = 13
3	43.22729 ab	nr = 14
4	52.15770 ab	nr = 10
5	4.08500 c	nr = 10

-----  
dms = 56.46772 x RaizQuadrado(1/nr1 + 1/nr2)  
Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 40.56715

CV% = 49.35

Ponto médio = 45.41250

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09311	0.11316	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.13826	0.12498	p < .05	Não
Anderson-Darling (A2)	0.97345	0.74326	p < .025	Não
Kuiper (V)	0.18180	0.18694	p > .05	Sim
Watson (U2)	0.13720	0.11506	p < .025	Não
Lilliefors (D)	0.09311	0.11344	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94356	-	0.00720	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	3498.08060	874.52015	2.2163 ns
Resíduo	48	18939.90644	394.58138	
Total	52	22437.98704		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	2.5656	2.2163	0.0812

##### MÉDIAS E MEDIDAS

###### Médias de tratamento

1	56.08933 a	nr = 12
2	36.66927 a	nr = 11
3	37.24675 a	nr = 12
4	35.34408 a	nr = 12
5	39.72633 a	nr = 6

dms = 56.32455 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 41.24306

CV% = 48.16

Ponto médio = 48.09850

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.98413	0.70124	Sim

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	12904.63568	3226.15892	14.4225 **
Resíduo	19	4250.08690	223.68878	
Total	23	17154.72258		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	4.5003	14.4225	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias de tratamento

1	55.62429 a	nr =	7
2	58.25375 a	nr =	4
3	55.64525 a	nr =	4
4	74.35780 a	nr =	5
5	1.67900 b	nr =	4

dms = 45.05228 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 50.97796

CV% = 29.34

Ponto médio = 45.41250

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.16455	0.17679	$p > .05$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.12311	0.12343	$p > .05$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.81310	0.70064	$p < .05$	Não
Kuiper (V)	0.27867	0.29103	$p > .05$	Sim
Watson (U2)	0.10741	0.11363	$p > .05$	Sim
Lilliefors (D)	0.12288	0.17600	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.90582	-	0.02865	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	15427.48790	3856.87197	16.4695 **
Resíduo	56	13114.19338	234.18202	
Total	60	28541.68127		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	56	3.6746	16.4695	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	44.08793 ab	nr = 14
2	42.10077 ab	nr = 13
3	32.28722 b	nr = 14
4	50.73950 a	nr = 10
5	1.77930 c	nr = 10

dms = 43.15977 x RaizQuadrado(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 35.11066

CV% = 43.59

Ponto médio = 37.50000

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09277	0.11316	$p > .15$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.10081	0.12498	$p > .10$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.87398	0.74326	$p < .025$	Não
Kuiper (V)	0.16797	0.18694	$p > .10$	Sim
Watson (U2)	0.09640	0.11506	$p > .05$	Sim
Lilliefors (D)	0.09277	0.11344	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94399	-	0.00754	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	10081.88930	2520.47233	8.7357 **
Resíduo	48	13849.24486	288.52593	
Total	52	23931.13417		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )



\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )  
 ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	3.7387	8.7357	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	46.09525 a	nr = 12
2	46.40973 a	nr = 11
3	35.00717 a	nr = 12
4	41.35783 a	nr = 12
5	0.82783 b	nr = 6

dms = 48.16392 x RaizQuadrado(1/nr1 + 1/nr2)  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.45277

CV% = 45.35

Ponto médio = 42.30750

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.97684	0.38926	Sim

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	9796.97981	2449.24495	6.1250 **
Resíduo	19	7597.70893	399.87942	
Total	23	17394.68874		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )  
 ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	4.5003	6.125	0.0024

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	60.12186 a	nr = 7
2	35.01450 ab	nr = 4
3	49.22850 a	nr = 4
4	47.46660 a	nr = 5
5	0.31625 b	nr = 4

dms = 60.23642 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 41.51763

CV% = 48.17

Ponto médio = 43.54800

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.93893	0.15441	Sim

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	23998.42092	5999.60523	19.9630 **
Resíduo	56	16830.02364	300.53614	
Total	60	40828.44456		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	56	3.6746	19.963	<0.001

##### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	56.51007 a	nr = 14
2	46.32208 a	nr = 13
3	24.16364 b	nr = 14
4	54.70660 a	nr = 10
5	2.17390 c	nr = 10

dms = 48.89345 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.71187

CV% = 45.97

Ponto médio = 42.18750

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
---------------------	-------	-------	---------	--------

Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12263	0.11316	p < .025	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.19857	0.12498	p < .01	Não
Anderson-Darling (A2)	1.37702	0.74326	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.23443	0.18694	p < .01	Não
Watson (U2)	0.19622	0.11506	p < .01	Não
Lilliefors (D)	0.11180	0.11344	p > .05	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.92578	-	0.00119	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	17355.45296	4338.86324	9.9601 **
Resíduo	48	20909.88201	435.62254	
Total	52	38265.33496		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	3.7387	9.9601	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	61.94783 a	nr = 12
2	40.58018 a	nr = 11
3	39.43017 a	nr = 12
4	55.16417 a	nr = 12
5	0.00000 b	nr = 6

dms = 59.18131 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 43.86581

CV% = 47.58

Ponto médio = 47.75000

## Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.96275	0.09709	Sim

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	17705.38745	4426.34686	10.6024 **

Resíduo	19	7932.25827	417.48728
---------	----	------------	-----------

Total	23	25637.64572
-------	----	-------------

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	4.5003	10.6024	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	83.32057 a	nr =	7
2	53.44150 a	nr =	4
3	48.34550 a	nr =	4
4	58.44860 a	nr =	5
5	0.46275 b	nr =	4

dms =  $61.54833 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 53.52025

CV% = 38.18

Ponto médio = 48.83900

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.16882	0.17679	$p > .05$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.12214	0.12343	$p > .05$	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.79349	0.70064	$p < .05$	Não
Kuiper (V)	0.28400	0.29103	$p > .05$	Sim
Watson (U2)	0.11477	0.11363	$p < .05$	Não
Lilliefors (D)	0.12715	0.17600	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.90120	-	0.02283	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	24995.87115	6248.96779	12.2041 **
Resíduo	56	28674.20394	512.03936	
Total	60	53670.07509		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
----	-----	--------	---	---

4                      56                      3.6746                      12.2041                      <0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	68.50136 a	nr = 14
2	56.70815 ab	nr = 13
3	50.38007 ab	nr = 14
4	38.27440 b	nr = 10
5	6.52530 c	nr = 10

dms = 63.81960 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 46.71382

CV% = 48.44

Ponto médio = 48.62600

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.10127	0.11316	p > .10	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.16432	0.12498	p < .025	Não
Anderson-Darling (A2)	1.01751	0.74326	p < .025	Não
Kuiper (V)	0.19479	0.18694	p < .05	Não
Watson (U2)	0.16160	0.11506	p < .025	Não
Lilliefors (D)	0.10127	0.11344	p > .10	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94183	-	0.00600	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	18896.02571	4724.00643	7.6271 **
Resíduo	48	29729.98848	619.37476	
Total	52	48626.01420		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	3.7387	7.6271	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	54.45933 ab	nr = 12
2	62.66782 a	nr = 11
3	57.48325 ab	nr = 12

4	33.14858	bc	nr =	12
5	2.37683	c	nr =	6

-----  
dms = 70.56773 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)  
Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 46.12643 CV% = 53.95  
NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.10087	0.12116	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.13328	0.12482	p < .05	Não
Anderson-Darling (A2)	0.92242	0.73788	p < .025	Não
Kuiper (V)	0.18907	0.20006	p > .05	Sim
Watson (U2)	0.13308	0.11492	p < .05	Não
Lilliefors (D)	0.08820	0.12170	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93587	-	0.00693	Não

Ponto médio = 47.79300  
EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	13777.43683	3444.35921	10.0550 **
Resíduo	19	6508.46226	342.55065	
Total	23	20285.89909		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)  
\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)  
ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	4.5003	10.055	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	67.21500	a	nr =	7
2	69.85400	a	nr =	4
3	53.08300	a	nr =	4
4	36.25280	ab	nr =	5
5	1.93150	b	nr =	4

-----  
dms = 55.75156 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)  
Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 47.96846

CV% = 38.58

Ponto médio = 48.33100

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.93435	0.12194	Sim

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	29628.72056	7407.18014	16.0625 **
Resíduo	56	25824.31284	461.14844	
Total	60	55453.03341		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	56	3.6746	16.0625	<0.001

##### MÉDIAS E MEDIDAS

###### Médias de tratamento

1	67.69379 a	nr = 14
2	61.48508 ab	nr = 13
3	51.99636 ab	nr = 14
4	37.33970 b	nr = 10
5	2.70070 c	nr = 10

dms =  $60.56514 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 47.13725

CV% = 45.56

Ponto médio = 48.98500

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09222	0.11316	$p > .15$	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.13344	0.12498	$p < .05$	Não
Anderson-Darling (A2)	1.01862	0.74326	$p < .025$	Não
Kuiper (V)	0.18421	0.18694	$p > .05$	Sim

Watson (U2)	0.13340	0.11506	p < .05	Não
Lilliefors (D)	0.09199	0.11344	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.93596	-	0.00327	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	18439.96156	4609.99039	10.1954 **
Resíduo	48	21703.94358	452.16549	
Total	52	40143.90514		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	3.7387	10.1954	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	62.39000 ab	nr = 12
2	68.80391 a	nr = 11
3	59.70192 ab	nr = 12
4	39.45683 b	nr = 12
5	8.33317 c	nr = 6

dms = 60.29456 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 51.80051

CV% = 41.05

Ponto médio = 46.71450

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.10579	0.12116	p > .10	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.09903	0.12482	p > .10	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.69865	0.73788	p > .05	Sim
Kuiper (V)	0.17911	0.20006	p > .10	Sim
Watson (U2)	0.09874	0.11492	p > .05	Sim
Lilliefors (D)	0.08692	0.12170	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94878	-	0.02385	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
----	----	----	----	---



Tratamentos	4	11471.63273	2867.90818	8.8526 **
Resíduo	19	6155.25194	323.96063	
Total	23	17626.88467		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	4.5003	8.8526	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	71.26443 a	nr =	7
2	59.67300 a	nr =	4
3	61.58300 a	nr =	4
4	58.07500 a	nr =	5
5	6.71225 b	nr =	4

dms =  $54.21766 \times \text{RaizQuadrd}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 54.21246

CV% = 33.20

Ponto médio = 45.84850

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.19238	0.17679	$p < .025$	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.15134	0.12343	$p < .025$	Não
Anderson-Darling (A2)	0.95104	0.70064	$p < .025$	Não
Kuiper (V)	0.29228	0.29103	$p < .05$	Não
Watson (U2)	0.13251	0.11363	$p < .05$	Não
Lilliefors (D)	0.15072	0.17600	$p > .15$	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.89057	-	0.01366	Não

#### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

##### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	11955.20680	2988.80170	17.4185 **
Resíduo	56	9608.89105	171.58734	
Total	60	21564.09785		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	56	3.6746	17.4185	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	46.71128 a	nr = 14
2	34.38431 ab	nr = 13
3	24.82350 b	nr = 14
4	39.04660 ab	nr = 10
5	4.22220 c	nr = 10

dms = 36.94409 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)  
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 30.83887

CV% = 42.48

Ponto médio = 33.33300

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09560	0.11316	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.05357	0.12498	p > .15	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.56614	0.74326	p > .10	Sim
Kuiper (V)	0.17344	0.18694	p > .10	Sim
Watson (U2)	0.05291	0.11506	p > .15	Sim
Lilliefors (D)	0.09560	0.11344	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.95762	-	0.03370	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	10843.27714	2710.81929	9.2075 **
Resíduo	48	14131.83436	294.41322	
Total	52	24975.11150		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p &lt; .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =&lt; p &lt; .05)

ns não significativo (p &gt;= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	3.7387	9.2075	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	50.31775 a	nr = 12
---	------------	---------

2	39.49091 a	nr = 11
3	39.36583 a	nr = 12
4	43.12742 a	nr = 12
5	0.00000 b	nr = 6

-----  
 $dms = 48.65282 \times \text{RaizQuadrd}(1/nr1 + 1/nr2)$   
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 38.26664

CV% = 44.84

Ponto médio = 49.65300

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95935	0.06877	Sim

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	5069.32653	1267.33163	5.4819 **
Resíduo	19	4392.51421	231.18496	
Total	23	9461.84074		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	4.5003	5.4819	0.0041

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	46.84114 a	nr = 7
2	33.92800 ab	nr = 4
3	39.10100 a	nr = 4
4	48.51340 a	nr = 5
5	6.69625 b	nr = 4

-----  
 $dms = 45.80094 \times \text{RaizQuadrd}(1/nr1 + 1/nr2)$   
 Onde nr1 e nr2 são os números de  
 repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 37.05650

CV% = 41.03

Ponto médio = 38.63600

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.97546	0.79990	Sim

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	30720.58571	7680.14643	14.0715 **
Resíduo	56	30564.50729	545.79477	
Total	60	61285.09301		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	56	3.6746	14.0715	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	73.60378 a	nr = 14
2	38.09015 b	nr = 13
3	32.32600 b	nr = 14
4	39.94990 b	nr = 10
5	2.50000 c	nr = 10

dms = 65.88963 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 39.38833

CV% = 59.31

Ponto médio = 48.00000

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12824	0.11316	$p < .025$	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.18052	0.12498	$p < .01$	Não
Anderson-Darling (A2)	1.42042	0.74326	$p < .01$	Não
Kuiper (V)	0.23714	0.18694	$p < .01$	Não
Watson (U2)	0.17514	0.11506	$p < .01$	Não
Lilliefors (D)	0.12824	0.11344	$p < .05$	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.91380	-	0.00039	Não

ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

<http://www.assistat.com>

=====

Data: 23/03/2014 Hora: 21:00:02

Hipótese nula (H0):  
Os tratamentos não são diferentes

Ao nível de 5% de probabilidade  
H = 32.7672 Hkrit = 9.4877  
p-valor < 0.05 H0 foi rejeitada

Ao nível de 1% de probabilidade  
H = 32.7672 Hkrit = 13.2767  
p-valor < 0.01 H0 foi rejeitada

Comparação dos tratamentos - Teste de Mann-Whitney

Trat1 x Trat2	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat1 x Trat3	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat1 x Trat4	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat1 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat2 x Trat3	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat2 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat2 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat3 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat3 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat4 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
-----		
Trat1 x Trat2	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat1 x Trat3	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat1 x Trat4	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat1 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat2 x Trat3	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat2 x Trat4	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat2 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat3 x Trat4	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat3 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat4 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes

OBSERVAÇÃO

Este programa faz a correção de H  
para dados iguais nos tratamentos

MÉDIAS

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos
1	14	73.60379	697.000
2	13	38.09015	412.500
3	14	32.32600	386.500
4	10	39.94990	311.500
5	10	2.50000	83.500

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
----	----	----	----	---

Tratamentos	4	23960.61592	5990.15398	8.7420 **
Resíduo	48	32890.34413	685.21550	

---

Total	52	56850.96006		
-------	----	-------------	--	--

---

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	3.7387	8.742	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	66.64442 a	nr = 12
2	56.36373 a	nr = 11
3	70.42575 a	nr = 12
4	43.36092 a	nr = 12
5	0.00000 b	nr = 6

dms = 74.22377 x RaizQuadrd( $1/nr1 + 1/nr2$ )

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 52.55045

CV% = 49.81

Ponto médio = 49.77750

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.14614	0.12116	$p < .01$	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.16850	0.12482	$p < .025$	Não
Anderson-Darling (A2)	1.38319	0.73788	$p < .01$	Não
Kuiper (V)	0.25994	0.20006	$p < .01$	Não
Watson (U2)	0.16214	0.11492	$p < .01$	Não
Lilliefors (D)	0.12727	0.12170	$p < .05$	Não
Shapiro-Wilk (W)	0.90852	-	0.00064	Não

=====

ASSISTAT - TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

<http://www.assistat.com>

=====

Data: 23/03/2014 Hora: 21:06:31

Hipótese nula (H0):

Os tratamentos não são diferentes

Ao nível de 5% de probabilidade

H = 18.9554 Hkrit = 9.4877

p-valor < 0.05 H0 foi rejeitada

Ao nível de 1% de probabilidade

H = 18.9554 Hkrit = 13.2767  
 p-valor < 0.01 H0 foi rejeitada

Comparação dos tratamentos - Teste de Mann-Whitney

Trat1 x Trat2	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat1 x Trat3	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat1 x Trat4	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat1 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat2 x Trat3	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat2 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat2 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat3 x Trat4	p-valor > 0.05	Não são diferentes
Trat3 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
Trat4 x Trat5	p-valor < 0.05	São diferentes
-----		
Trat1 x Trat2	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat1 x Trat3	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat1 x Trat4	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat1 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat2 x Trat3	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat2 x Trat4	p-valor > 0.10	Não são diferentes
Trat2 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat3 x Trat4	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat3 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes
Trat4 x Trat5	p-valor < 0.10	São diferentes

OBSERVAÇÃO

Este programa faz a correção de H  
 para dados iguais nos tratamentos

MÉDIAS

Tratamento	Repetições	Média	SomaDosPostos
1	12	66.64442	393.000
2	11	56.36373	308.500
3	12	70.42575	430.000
4	12	43.36092	269.500
5	6	0.00000	30.000

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
-----				
Tratamentos	4	4168.24386	1042.06096	1.7259 ns
Resíduo	19	11471.68700	603.77300	
-----				
Total	23	15639.93085		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	2.8951	1.7259	0.1859

MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	69.85658 a	nr = 7
2	57.94750 a	nr = 4
3	84.51950 a	nr = 4
4	52.09900 a	nr = 5
5	44.99150 a	nr = 4

dms = 74.01700 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 62.47188

CV% = 39.33

Ponto médio = 45.12150

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.19457	0.17679	p < .025	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.13860	0.12343	p < .05	Não
Anderson-Darling (A2)	0.87891	0.70064	p < .025	Não
Kuiper (V)	0.33801	0.29103	p < .01	Não
Watson (U2)	0.12453	0.11363	p < .05	Não
Lilliefors (D)	0.15291	0.17600	p > .10	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.89177	-	0.01446	Não

## EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

## QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	20157.67698	5039.41925	16.8990 **
Resíduo	56	16699.65409	298.20811	
Total	60	36857.33107		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 ≤ p < .05)

ns não significativo (p ≥ .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	56	3.6746	16.899	<0.001

## MÉDIAS E MEDIDAS

## Médias de tratamento

1	53.78429 a	nr = 14
2	45.14100 ab	nr = 13
3	34.21807 b	nr = 14
4	50.98370 ab	nr = 10
5	0.41760 c	nr = 10

dms = 48.70372 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)



Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas  
nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 38.24392

CV% = 45.15

Ponto médio = 41.79100

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.09029	0.11316	p > .15	Sim
Cramér-von Mises (W2)	0.11791	0.12498	p > .05	Sim
Anderson-Darling (A2)	0.85908	0.74326	p < .05	Não
Kuiper (V)	0.17372	0.18694	p > .10	Sim
Watson (U2)	0.11620	0.11506	p < .05	Não
Lilliefors (D)	0.09029	0.11344	p > .15	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94686	-	0.01024	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	14847.83997	3711.95999	9.1010 **
Resíduo	48	19577.48413	407.86425	
Total	52	34425.32410		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	48	3.7387	9.101	<0.001

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	54.56300 a	nr = 12
2	43.20964 a	nr = 11
3	56.53400 a	nr = 12
4	43.73217 a	nr = 12
5	0.00000 b	nr = 6

dms = 57.26473 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 44.02370

CV% = 45.87

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.12879	0.12116	p < .05	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.13006	0.12482	p < .05	Não
Anderson-Darling (A2)	0.95272	0.73788	p < .025	Não
Kuiper (V)	0.23620	0.20006	p < .01	Não
Watson (U2)	0.12208	0.11492	p < .05	Não
Lilliefors (D)	0.10992	0.12170	p > .10	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.94194	-	0.01229	Não

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO  
QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	9257.58402	2314.39600	13.7387 **
Resíduo	19	3200.71472	168.45867	
Total	23	12458.29874		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	19	4.5003	13.7387	<0.001

MÉDIAS E MEDIDAS  
Médias de tratamento

1	59.27571 a	nr =	7
2	40.77800 a	nr =	4
3	41.76775 a	nr =	4
4	47.21840 a	nr =	5
5	0.00000 b	nr =	4

dms = 39.09681 x RaizQuadrd(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de  
repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 40.88354

CV% = 31.75

Ponto médio = 36.53800

NORMALIDADE (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Kolmogorov-Smirnov (D)	0.19416	0.17679	p < .025	Não
Cramér-von Mises (W2)	0.16940	0.12343	p < .025	Não
Anderson-Darling (A2)	1.04420	0.70064	p < .01	Não
Kuiper (V)	0.32134	0.29103	p < .025	Não
Watson (U2)	0.15435	0.11363	p < .025	Não
Lilliefors (D)	0.15250	0.17600	p > .10	Sim
Shapiro-Wilk (W)	0.88584	-	0.01091	Não